ENTWICKLUNG EINER TABAK-ZELLSUSPENSIONSKULTUR ZUR INFEKTION MIT TABAKMOSAIKVIRUS UND VERGLEICH DER INFIZIERBARKEIT MIT TABAKMOSAIKVIRUS-RNS, fd-PHAGEN UND fd-PHAGEN-DNS VON PROTOPLASTEN AUS ZELLEN IN SUSPENSIONSKULTUR UND VON PROTOPLASTEN AUS TABAKBLÄTTERN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Naturwissenschaften

der
Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
GABRIELE MERTES
aus Stuttgart

1983

ENTWICKLUNG EINER TABAK-ZELLSUSPENSIONSKULTUR ZUR INFEKTION MIT TABAKMOSAIKVIRUS UND VERGLEICH DER INFIZIERBARKEIT MIT TABAKMOSAIKVIRUS-RNS, fd-PHAGEN UND fd-PHAGEN-DNS VON PROTOPLASTEN AUS ZELLEN IN SUSPENSIONSKULTUR UND VON PROTOPLASTEN AUS TABAKBLÄTTERN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Naturwissenschaften

der
Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
GABRIELE MERTES
aus Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	10. Februar 1983
Dekan	Prof. Dr. K. P. Hadeler
1. Berichterstatter	Prof. Dr. E. Sander
2. Berichterstatter	Prof. Dr. V. Braun

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Frau Prof. Dr. E. Sander am Institut für Biologie II der Universität Tübingen durchgeführt.

Frau Prof. Sander möchte ich für die gute Beratung und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Frank am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen danke ich für die Arbeiten am Elektronenmikroskop und nützliche Gespräche, Frau Kleih für die Fixierung und Einbettung von Protoplasten. Herrn Dr. Schwarz am Max-Planck-Institut für Biologie danke ich für die Durchführung der Mikroautoradiographie.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0007

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	5
1.	Material	5
1.1.	Virus	5
1.2.	Phage	5
1.3.	Antikörper	5
1.3.1.	TMV-Antikörper	5
1.3.2.	fd-Antikörper	5
1.4.	Bakterien	6
1.5.	Pflanzen	6
1.6.	Zellsuspensionskulturen	6
1.6.1.	Sojazellsuspension	6
1.6.2.	Tabakzellsuspension	6
1.7.	Puffer und Lösungen	6
1.8.	Kulturmedien	9
1.9.	Chemikalien	11
1.10.	Geräte	13
1.11.	Abkürzungen	14
2.	Methoden	15
2.1.	Versuchsmaterial	16
2.1.1.	Anzucht von Tabakpflanzen	16
2.1.2.	Kultur einer Sojazellsuspension (*Glycine max*)	16
2.1.3.	Anzucht einer Tabakzellsuspension	16
2.1.3.1.	Anzucht von Tabakkeimlingen und von Tabakkallusgewebe aus Keimlingen	16
2.1.3.2.	Regeneration von Protoplasten aus Tabakblättern zu Kallusgewebe	18
2.1.3.3.	Anzucht einer Tabakzellsuspensionskultur; Vergleich verschiedener Wuchsstoffe	18

2.1.4.	Inocula	20
2.1.4.1.	Vermehrung und Reinigung des fd-Phagen	20
2.1.4.2.	Radioaktive Markierung der DNS in fd-Phagen	21
2.1.4.3.	Isolierung von fd-DNS	21
2.1.4.4.	Isolierung von TMV-RNS	22
2.2.	Protoplastentechnik	23
2.2.1.	Protoplastenisolierung aus Tabakblättern	23
2.2.2.	Protoplastenisolierung aus einer Sojazellsuspension	25
2.2.3.	Protoplastenisolierung aus einer Tabakzellsuspension	25
2.2.4.	Beurteilung und Berechnung der Protoplastenausbeute	26
2.3.	Infektionsversuche	26
2.3.1.	Infektionsversuche mit TMV-RNS und Protoplasten	26
2.3.1.1.	Nachweis der Infektiosität der TMV-Nachfolgepartikeln im Ganzblatt-Biotest	29
2.3.1.2.	Nachweis von TMV-Protein in mit TMV-RNS infizierten Protoplasten durch Immunfluoreszenz	29
2.3.2.	Infektionsversuche mit fd-Phage und Protoplasten	30
2.3.3.	Infektionsversuche mit fd-DNS und Protoplasten aus Tabakblättern	31
2.3.3.1.	Nachweis von fd-Nachfolgepartikeln im Plaquetest	32
2.3.3.2.	Test auf fd-Protein in Tabakprotoplasten durch Immunfluoreszenz	33
2.3.3.3.	Lokalisierung von fd-DNS in Tabakprotoplasten durch Autoradiographie	34
2.3.4.	Infektionsversuche mit TMV und Zellen einer Tabakzellsuspensionskultur	35

2.3.4.1.	Nachweis der Infektiosität der TMV Nachfolgepartikeln im Halbblatt-Biotest	35
2.4.	Langfristige Konservierung pflanzlicher Zellsuspensionskulturen durch Einfrieren	36
III.	Ergebnisse	39
3.1.	Phagenausbeute bei der Vermehrung und Reinigung des fd-Phagen	39
3.2.	fd-DNS-Ausbeute und -Infektiosität	39
3.2.1.	Radioaktive Markierung der fd-DNS	39
3.3.	TMV-RNS-Ausbeute und -Infektiosität	40
3.4.	Anzucht von Tabakkallusgewebe	40
3.5.	Vergleich des Einflusses verschiedener Wuchsstoffe auf das Wachstum einer Tabakzellsuspension	41
3.6.	Protoplastenisolierung	44
3.7.	Infektionsversuche mit TMV-RNS- und Protoplasten	47
3.7.1.	Nachweis von TMV in Tabakprotoplasten durch Immunfluoreszenz	50
3.8.	Infektionsversuche mit fd-Phage und Protoplasten	52
3.9.	Infektion von Protoplasten aus Tabakblättern mit fd-DNS	57
3.9.1.	Nachweis infektiöser Phagenpartikeln in Tabakprotoplasten	57
3.9.2.	Test auf fd-Protein in Tabakprotoplasten durch Immunfluoreszenz	57
3.9.3.	Lokalisierung von fd-DNS in Tabakprotoplasten durch Autoradiographie	57
3.9.3.1.	Elektronenmikroskopie nichtinfizierter Tabakprotoplasten aus Blättern	60
3.10.	TMV-Synthese in Zellen einer Tabakzellsuspensionskultur	65

3.11.	Konservierung pflanzlicher Zellsuspensionskulturen durch Einfrieren	67
IV.	Diskussion	68
V.	Zusammenfassung	83
VI.	Literaturverzeichnis	85

I. Einleitung

Die von Takebe 1968 entwickelte Methode zur Isolierung von Protoplasten aus höheren Pflanzen ermöglicht auch bei diesen Organismen die Durchführung molekularbiologischer Untersuchungen auf zellulärer Ebene, die Klärung zahlreicher Fragen aus dem Bereich der Pflanzenvirologie sowie neue Wege der Genmanipulation.

Wichtig für die Durchführung zellbiologischer und virologischer Untersuchungen ist die Möglichkeit, Einzelzellen unter kontrollierten Bedingungen kultivieren, repräsentative Proben nehmen und Puls-Chase-Experimente durchführen zu können, wie dies bei mikrobiologischen Objekten seit langem bekannt ist. Mit ganzen Blättern oder Gewebekulturen sind derartige Experimente kaum möglich, da der Anteil infizierbarer Zellen sehr gering ist, der Background nicht infizierter Zellen entsprechend hoch (Zaitlin et al., 1974) und die Infektion und Biosynthese in den Zellen asynchron verlaufen.

Für Virusinfektionen stellt die pflanzliche Zellwand die Hauptbarriere dar, so dass die Möglichkeit der Isolierung und Kultur zellwandloser Einzelzellen aus höheren Pflanzen die Voraussetzung für das Studium von Virusinfektion und -replikation war.

Für die Untersuchung der genannten Probleme bietet die Infektion mit viraler Nukleinsäure statt Viruspartikeln die Vorteile eines absoluten Neubeginns der Virusproteinsynthese ohne Background nicht aufgenommener infektiöser Virusrückstände. Von mehreren Autoren (Takebe, 1969; Sarkar, 1974; Okuno u. Furusawa, 1978) wurde ein Infektionssystem für Protoplasten aus höheren Pflanzen und Virusnukleinsäure aufgestellt. Ein diesbezüglich besonders effizientes System wäre nicht nur für pflanzen-

virologische Fragestellungen, sondern auch für genetische Experimente zur Übertragung jedweder Nukleinsäure von Interesse.

Da bei der Arbeit mit Protoplasten aus Blattmaterial zahlreiche Schwierigkeiten auftreten, verbunden mit der Abhängigkeit der Funktionstüchtigkeit der Protoplasten von der Jahreszeit und dem physiologischen Zustand des Ausgangsmaterials (Takebe et al., 1968; Watts et al., 1974), stellt die Isolierung und Infektion von Protoplasten aus Zellsuspensionskulturen neuerdings ein verbessertes, weil kontinuierlich zur Verfügung stehendes Infektionssystem dar (Mertes, 1979; Jarvis u. Murakishi, 1980). Zellkulturen als Ausgangsmaterial sind zudem steril und die Präparation der Protoplasten ist im Vergleich zur Präparation aus Blattmaterial vereinfacht.

Bisher wurden Sojazellsuspensionskulturen (Glycine max) zur Protoplastenisolierung und anschliessenden Infektion mit Pflanzenviren verwendet (Mertes, 1979; Jarvis u. Murakishi, 1980). In vergleichenden Experimenten mit Protoplasten aus einer Sojazellsuspensionskultur und Protoplasten aus Tabakblättern wurden Infektionserfolge gleicher Grössenordnung erzielt (Mertes, 1979), jedoch waren nur die Infektionserfolge mit Protoplasten aus einer Sojasuspensionskultur von der Jahreszeit unabhängig. In Anlehnung an dieses Testsystem sollte eine kontinuierliche Tabakzellsuspensionskultur, deren Zellen auch zur Protoplastenisolierung geeignet sind, entwickelt werden.

Protoplasten werden auch als Screening-System für antiviral wirkende Substanzen diskutiert (Mertes u. Sander, 1981) und erprobt. Für diese Fragestellung reicht eine rein quantitative Erfassung der Virussynthese in einem

System zunächst aus, wobei für routinemässige Tests ein möglichst schnelles und einfaches Infektionssystem von Vorteil wäre. Die Herstellung und Handhabung von Protoplasten erscheint für diesen Zweck zu aufwendig auch bei Verwendung von Zellsuspensionskulturen als Ausgangsmaterial. Da Protoplasten aus kontinuierlichen Zellsuspensionskulturen bereits erfolgreich für Infektionsversuche mit Viren verwendet werden, lag es nahe, mit einer möglichst einfachen Methode Zellen einer Suspensionskultur mit Virus zu infizieren. Hierzu sollte die Tabakzellsuspension verwendet werden, deren Zellen eine Untersuchung potentieller antiviraler Substanzen an Protoplasten, d.h. auf zellulärer Ebene, bei Bedarf erlauben.

Da bei Infektion mit Viruspartikeln von Protoplasten aus einer Sojazellsuspensionskultur und Protoplasten aus Tabakblättern vergleichbare Infektionserfolge möglich sind, sollten vergleichende Untersuchungen auch auf die Infektion mit freier Virusnukleinsäure ausgedehnt werden. Protoplasten sowohl aus Tabakblättern als auch aus Zellsuspensionskulturen sollten in dieser Arbeit zur Klärung der Frage herangezogen werden, ob Tabakmosaikvirus-RNS von den Protoplasten aufgenommen und in diesen Virusvermehrung hervorrufen kann. Ausserdem sollte die Aufnahme einer isolierten DNS in die Protoplasten untersucht werden. Hierzu wurde die DNS des Bakteriophagen fd_{k12} gewählt. Sander (1964 u. 1967) konnte in Tabakpflanzen nach Infektion mit fd-DNS die Synthese von Phagenprotein, resultierend in intakten, infektiösen Phagenpartikeln, nachweisen. Pflanzenprotoplasten aus Hordeum waren von Carlson (1973) zur Infektion mit T_3-Phagen verwendet worden, wobei die Synthese zweier phagenspezifischer Enzyme nachgewiesen werden konnte.

Der Nachweis der TMV-Synthese bzw. Phagenhüllproteinsynthese in Protoplasten wurde durch Infektiositätstests sowie durch den Nachweis von Protein mittels Immunfluoreszenz geführt.

Der Umgang mit pflanzlichen Zellkulturen erfordert regelmässiges Umsetzen der Kultur und genaueste Einhaltung der Kulturbedingungen. Dies ist verbunden mit der Möglichkeit von Kontaminationen (oder menschlichem und technischem Versagen). Daher wäre es ein grosser Vorteil, pflanzliche Zellkulturen durch Einfrieren und Rekultivierung erhalten und konservieren zu können. Das Einfrieren lebenden Materials wird bisher nur mit tierischen Zellen routinemässig durchgeführt (Withers, 1980). Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher verschiedene Methoden des Einfrierens auch mit pflanzlichen Zellkulturen erprobt werden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Virus

Der Typstamm von Tabakmosaikvirus (TMV-vulgare, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen) lag als ein über Saccharose und CsCl gereinigtes Präparat (MPI_3') vor.

1.2. Phage

Es wurde ein fd-Phagenpräparat verwendet, welches über *E. coli* K_{12}Hfr C 6 vermehrt und über CsCl gereinigt war. Der Phage war ursprünglich von Professor Hoffmann-Berling, Abt. für Molekulare Biologie, Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, zur Verfügung gestellt worden.

1.3. Antikörper

1.3.1. TMV-Antikörper

Es lag ein Präparat über DEAE-Sepharose gereinigter γ-Globuline (1 mg/ml) vor, die aus dem Serum TMV-immunisierter Kaninchen (Titer nach Bestimmung im ELISA: 1:8192) gewonnen worden waren.

1.3.2. fd-Antikörper

Es lag ein Serum fd-immunisierter Kaninchen (Titer nach Bestimmung im Ouchterlony-Test: 1:256 bei 1 mg/ml Antigen) vor.

1.4. Bakterien

Der Bakterienstamm *E. coli* K_{12}Hfr C 6 wurde zur Phagenvermehrung sowie als Indikatorstamm verwendet. Er war ursprünglich von Professor Hoffmann-Berling zur Verfügung gestellt worden.

1.5. Pflanzen

Nicotiana tabacum cv. Xanthi nc. wurde als Lokalläsionenwirt für TMV bei Biotests sowie zur Isolierung von Protoplasten aus Blättern verwendet. Ausserdem wurden Keimlinge zur Anzucht von Tabakkallusgewebe verwendet.

1.6. Zellsuspensionskulturen

1.6.1. Sojazellsuspension

Zur Protoplastenisolierung wurde eine kontinuierliche Zellsuspension (*Glycine max*) verwendet (Mertes u. Sander, 1981).

1.6.2. Tabakzellsuspension

Aus *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. wurde eine kontinuierliche Zellsuspension hergestellt.

1.7. Puffer und Lösungen

Glycin-KOH-Puffer, 0,1 M, pH 8,8
(nach Glycin-NaOH-Puffer, Dokum. Geigy, 1968)

K^+-Citratpuffer, 40mM, pH 4,7, 0,5 M Mannit
(Dokum. Geigy, 1968)
K^+-Citratpuffer, 20mM, pH 5,2, 0,7 M Mannit
(Dokum. Geigy, 1968)

Es wurde eine 0,1 M Pufferstammlösung hergestellt, in die 0,5 M bzw. 0,7 M Mannit eingewogen wurde. Mit aqua dest. wurde auf 40mM bzw. 20mM Puffer verdünnt.

Na-Acetatpuffer, 0,1 M, pH 6
(Adam, 1976)

Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5
- 0,1 M Tris
- 5 mM Na_2EDTA

Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5, +1% SDS
- 100 ml Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5
- 1 g SDS

pp-Tris-Puffer, pH 7,2
- 1 M NaCl
- 1 M Tris
- 1 M $MgCl_2$
- 1 % Gelatine

Kirby-Mix-Chloroform
- 88 ml Phenol
- 12 ml m-Kresol
- 0,1 g 8-Hydroxychinolin

gemischt 1:1 mit Chloroform

PBS, pH 7,2

8,0 g NaCl
0,2 g KCl
1,5 g Na_2HPO_4
0,2 g KH_2PO_4

wurden in 1l aqua dest. gelöst und der pH-Wert mit 0,1 N HCl eingestellt.

Soerensen-Phosphatpuffer, 0,1 M, pH 8,0
(Dokum. Geigy, 1968)

Anorganische Salzlösung für Protoplastenenzymgemisch (Negrutiu, Beetfink und Jakobs, 1975)

0,2 mM KH_2PO_4
1 mM KNO_3
1 mM $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$
1 mM $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,001 mM KJ

Enzymstandardlösungen

a) Zur Isolierung von Protoplasten aus Blättern wurden folgende Lösungen verwendet:

A) Zwei-Schritt-Methode (Takebe et al., 1968)

Lösung 1:1 % Macerocym
0,5% Kaliumdextransulfat
0,5 M Mannit
pH 5,8

Lösung 2:1 % Cellulase
0,5 M Mannit
pH 5,2

B) Ein-Schritt-Methode

0,5 % Macerocym
1,5 % Cellulase
0,5 M Mannit
1:10 verdünnte anorganische Salzlösung
pH 5,5

b) Zur Isolierung von Protoplasten aus einer Zellsuspension wurden

2 % Cellulase
1 % Macerocym
0,35 M Mannit
0,35 M Sorbit

in 1:10 verdünnter anorganischer Salzlösung gelöst, pH 5,5 (Negrutiu, Beetfink u. Jakobs, 1975). Für Isolierungen aus einer Tabakzellsuspension wurden 1 % KDS zugegeben.

Bei einem Teil der Experimente wurde Mannit ersetzt durch ein Salz-Plasmolytikum (Sarkar, 1974, modifiziert nach Meyer, 1974) aus

2,5 % KCL
1 % $MgCl \cdot 6 H_2O$

1.8. Kulturmedien

a) Kulturmedien für Pflanzenzellkulturen und Protoplasten (Angaben in mg/l)

	Gamborg-B_5-Medium nach Gamborg, Miller u. Ojima, 1968	NT-Medium nach Nagata u. Takebe 1971	Medium nach Negrutiu et al., 1975
NÄHRSALZE			
NH_4NO_3	-	825,0	-
$(NH_4)_2SO_4$	126,0	-	268,0
KNO_3	2 085,0	950,0	5 000,0
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	150,0	220,0	300,0
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	250,0	1 233,0	500,0

	Gamborg-B_5-Medium nach Gamborg, Miller u. Ojima, 1968	NT-Medium nach Nagata u. Takebe 1971	Medium nach Negrutiu et al., 1975
KH_2PO_4	-	680,0	-
Na_2-EDTA	-	37,3	37,2
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150,0	-	300,0
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	-	27,8	27,8
Sequestrene	28,0	-	-
SPURENELEMENTE			
H_3BO_3	3,0	6,2	3,0
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10,0	17,4	10,0
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	2,0	10,32	3,0
KJ	0,25	0,83	1,5
$NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,75	0,25	0,25
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,039	0,025	0,25
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,025	-	0,25
$CoSO_4 \cdot 7 H_2O$	-	0,3	-
ORGANISCHE VERBINDUNGEN			
Myo-Inositol	10,0	100,0	100,0
Thiamin·HCl	10,0	1,0	0,1
Auxin	1,0(2,4-D)	3,0(NAA)	1,0(2,4-D)
Kinetin	-	1,0	0,05
Saccharose	20 000,0	10 000,0	20 000,0
Nicotinsäure	1,0	-	1,0
Pyridoxin·HCl	1,0	-	1,0
Glycin	-	-	4,0

Für die Erstellung einer Tabakzellsuspension wurden für das Gamborg-B_5-Medium fünf verschiedene Wuchsstoffkombinationen untersucht (s. Kap. 2.1.3.3.)
Für die Regeneration von Protoplasten aus Tabakblättern zu Kallusgewebe wurde der Auxingehalt des NT-Mediums auf 1/10 reduziert (NT 1/10-Medium).
Die Medien wurden wahlweise mit oder ohne Mannit bzw. Agar (0,7%) hergestellt.
Von Nährsalzen und Spurenelementen wurden 10fach bzw. 100fach konzentrierte Stammlösungen hergestellt. Für das G-B_5-Medium wurde auch von den organischen Verbindungen eine Stammlösung hergestellt.
Alle Medien wurden 20 min bei 120°C autoklaviert.
Von allen Wuchsstoffen wurden geeignete Stammlösungen hergestellt, sterilfiltriert und den autoklavierten Medien zugegeben.

b) Kulturmedien für Bakterien
TIC-Medium (Knippers, 1966).

1.9. Chemikalien

Behringwerke AG, Marburg/Lahn
Anti-Kaninchen-γ-Globulin, Fluorescein-conjugiert, von der Ziege (12 ± 5 mg/ml)
Carborundum-Werke GmbH, Düsseldorf
Carborundum, 200 mesh
Chroma Gesellschaft
Eiweiß-Glycerin
Difco-Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto-Trypton
Fluka AG, Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm
Calciumhypochlorit
Epon 812
Geigy Chem. Co., Agricultural Chemical Division, Ardsley, N.Y.
Sequestrene 330

Kinki Yakult, Nishinomiya, Japan

Macerocym, Enzympräparat aus Rhizopus spec.

Cellulase "Onozuka" SS, Enzympräparat aus Trichoderma viride

Meito Sangyo, Nagoya, Japan

Kaliumdextransulfat, MG Dextran ca. 560, Schwefelgehalt 17,1%

Serva Feinbiochemika, Heidelberg

Agar Agar (reinst)

Glutaraldehyd (reinst)

Glycin

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure reinst (2,4-D)

L-Prolin (reinst)

Dimethylsulfoxid (reinst)

Albumin aus Rinderserum (rein)

Dodecylsulfat-Na-Salz

Cycloheximid, (krist. rein)

Sigma Chemical Company, St. Louis, USA

Poly-L-α-Ornithine HBr Type I-C (MG = 270 000)

Thiamine HCl

Pyridoxine

Myo-Inositol

Sojapepton, Typ III

Theodor Schuchard, München

6 Benzyladenin

1-Naphtalinessigsäure

Merck, Darmstadt

(alle Salze waren p.a.)

p-Aminosalicylsäure-Na-Salz

Ammoniumnitrat

Ammoniumsulfat

Äthylendiamintetraessigsäure -Dinatriumsalz (EDTA)

Borsäure

Kaliumnitrat

Kobalt(II)-chlorid

Kobalt(II)-sulfat

m-Kresol

Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat

Calciumchlorid-2-hydrat
Cäsiumchlorid
Chloroform
Citronensäure-1-hydrat
Eisen(II)-sulfat
Essigsäure, 100%
Gelatine
Glycerin, wasserfrei, 1,26
8-Hydroxychinolin
Indolessigsäure-(3)
Kaliumchlorid
di-Kaliumhydrogenphosphat-3-hydrat
Kaliumhydrogenphosphat
Kaliumhydroxydplätzchen
Kaliumjodid
Magnesiumsulfat
Mangan(II)-sulfat-1-hydrat
D(-)-Mannit Erg B 6
Natriumacetat (krist.)
Natriumchlorid
di-Natriumhydrogenphosphat
Natriummolybdat
Nicotinsäure
Orthocid
Phenol
Polyvinylpyrrolidon (PVP)
Saccharose
Sorbit
Tris-hydroxymethylaminomethan
Zinksulfat-7-hydrat

Radioaktive Substanz: (6-^{3}H)-Thymidin, 23 Ci/mmol
Fa. Amersham-Buchler GmbH & Co. KG

1.10. Geräte

Beckmann Ultrazentrifuge Modell L 5-65
Zentrifugen Sorvall superspeed RC 2-B und RC 5
Zentrifuge Typ UJ 2 "Minifuge", Fa. Christ, Osterode, Harz
Westfalia Separator Typ LWA 205 "Schlammzentrifuge", Westfalia Separator AG, Oelde, Westf.
Schüttelwasserbad Typ 1083, Ges. für Labortechnik, GFL, Hannover Vinhorst
Rotationsschüttelmaschine SM 25, Fa. Bühler, Tübingen
Vortex-Mixer, Fa. Retsch KG, Haan, Rheinl.
M & S-Purobank, Typ PBO/H 10/6, Fa. Meissner und Wurst
Zeiss-Standardmikroskop mit Fluoreszenzaufsatz 2 FL
Zeiss-Phasenkontrastmikroskop

Zeiss-Spektralphotometer, Modell PMQ 3 mit MT5-Küvetten

Zeiss-Refraktometer

Flüssigkeits-Szintillationszähler Packard "Tri-Carb" 3385
Fa. Packard, Frankfurt

Blattrührfermenter "p.e.c. fermentor" Typ F 0020,
Fa. Chemap GmbH, Düsseldorf

Klimaschrank, Fa. K. Fr. Stiel, Tübingen

Sterilfiltrationsgerät SM 16510, Membranfilter SM 11307 mit
0,2 µm Porengrösse, Fa. Sartorius, Göttingen

24-well-tissueculture-cluster-Platten, Fa. Costar, Kat.-Nr. 3524
Cambridge, Ma, USA

Weitmündige Pipetten mit einer Öffnung von 2 mm,
sog. Kommagomepipetten

Nylonnetze, Typ NY 100 HD und Typ NY HD, Zuericher Beuteltuchfabrik AG

Zählkammer nach Thoma:	Tiefe der Kammer	0,1	mm
	Fläche des Grossquadrats	0,4	mm^2
	Volumen des Grossquadrats	$4 \cdot 10^{-6}$	ml

Ultramikrotom LKB 2128, LKB Instrumente GmbH, Gräfelfing

programmierter Einfrierautomat R 201, Messer GV Planer LTD,
Sunburg-on-Thames, England

1.11. Abkürzungen

Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	Counts pro min
2,4-D	Dichlorphenoxyessigsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EK	Erlenmeyerkolben
Ext.	Extinktion
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
G-B_5	Gamborg-B_5

h	Stunde
IAA	Indolessigsäure
i.c.	infective centers
KDS	Kaliumdextransulfat
l	Liter
M	Molar
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
m.o.i.	Multiplicity of Infection
NAA	Naphtalinessigsäure
nm	Nanometer
NT	Nagata und Takebe
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
p.i.	post infectionem
pfu	plaque forming units
PLO	Poly-L-Ornithin
PP	Protoplasten
PVP	Poly-vinylpyrrolidon
RLF	relative Luftfeuchtigkeit
RNS	Ribonukleinsäure
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TMV	Tabakmosaikvirus
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge
v	volume
w	weight

2. Methoden

2.1. Versuchsmaterial

2.1.1. Anzucht von Tabakpflanzen

Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 26± 10°C und etwa 70% Luftfeuchtigkeit angezogen. Von Dezember bis März erhielten die Pflanzen täglich von 6-22 Uhr 1000 Lux Zusatzlicht. Für Protoplastenisolierungen und Biotests wurden die Pflanzen ca. 5 Tage vor Versuchsbeginn im Labor bei ca. 40% Luftfeuchtigkeit weiterkultiviert.

Für Biotests wurden die Pflanzen 80-100 Tage nach der Aussaat verwendet. Zur Protoplastenisolierung wurden die Blätter von 45-60 Tage alten Pflanzen genommen.

2.1.2. Kultur einer Sojazellsuspension (*Gylcine max*)

Die Zellsuspensionskultur (Mertes u. Sander, 1981) wurde in je 100 ml Gamborg-B_5-Medium bei 28°C und 100 upm auf einer Rundschüttelmaschine gehalten und alle 4-5 Tage mit frischem Medium ca. 1:10 verdünnt.

2.1.3. Anzucht einer Tabakzellsuspension

2.1.3.1. Anzucht von Tabakkeimlingen und von Tabakkallusgewebe aus Keimlingen

Für die Anzucht einer Zellsuspension ist lockeres, undifferenziertes Kallusgewebe am besten geeignet.

Zur Anzucht von Tabakkeimlingen wurde eine entsprechende Menge Samen mit einer Spatelspitze Trokkenbeizmittel Orthocid 10 min geschüttelt und unter sterilen Bedingungen in einem Nylonnetz (0,2 mm Maschenweite) 30 sec mit 70% Äthanol und 15 min mit 0,7% Ca-Hypochlorit behandelt sowie anschliessend zehnmal in aqua dest. gewaschen. In eine Costar-Gewebekulturplatte wurde in jeden von 24 Näpfen mit je 200 µl aqua dest. ein Samen überführt (Vermeidung der Ausbreitung einer evtl. Kontamination) und die Platte bei 18°C und einem Licht-Dunkel-Wechsel von 16:8 h (3200 Lux) inkubiert). Alle 10 Tage wurden je Napf 100 µl Nährmedium nach Negrutiu (1975) zugegeben.

Keimlinge (Gesamtlänge bis 5 mm) wurden mit einem Skalpell unter sterilen Bedingungen zerkleinert, auf Negrutiu-Nähragar in Costar-Gewebekulturplatten (je Napf 1,5 ml Agar) übertragen und unter den gleichen Bedingungen wie die Samen weiterinkubiert zur Kallusbildung.

Kalli wurden, wenn sie eine Grösse von ca. 0,5 cm erreicht hatten, auf Agarplatten mit Negrutiumedium übertragen. Nach weiterem Wachstum bis auf eine Grösse von mindestens 1 cm wurde zur Induktion von lockerem Kallusgewebe das Medium gewechselt und Gamborg-B_5-Medium (Kinetinfrei, s. 1.8.) zur Weiterkultur verwendet. Die Kalli wurden entweder sofort auf kinetinfreien Agar gesetzt oder zunächst eine Woche in Suspensionskultur genommen (6 Kalli auf 90 ml G-B_5-Flüssigmedium). Mit dieser Rohkultur aus mechanisch zerkleinertem Gewebe und ersten in Suspension gewachsenen Zellen wurde eine Kalluskultur auf G-B_5-Agar initiiert. Die Kulturen wurden bei 28°C im Dunkeln inkubiert und im Abstand von 10-16 Tagen auf neuen Nähragar übertragen.

2.1.3.2. Regeneration von Protoplasten aus Tabakblättern zu Kallusgewebe

Um absolut steriles Ausgangsmaterial, welches bereits an *in-vitro*-Bedingungen angepasst ist, zur Anzucht einer Zellsuspension zu verwenden, wurden Protoplasten aus Tabakblättern isoliert und auf geeignetem Nährmedium zur Kallusbildung inkubiert.

Hierzu wurden isolierte Protoplasten auf $1 \cdot 10^5$ intakte PP/ml verdünnt. In eine Costar-Gewebekulturplatte mit 1,5 ml NT 1/10-Nähragar in jedem von 24 Näpfen wurde auf diese Agarunterlage jeweils ein Filterpapierscheibchen (Partanen, 1981) gelegt. Auf dessen Oberfläche wurde mit einer Pasteurpipette je 1 Tropfen Protoplastensuspension gegeben. Die Platte wurde bei 25°C und einem Licht-Dunkel-Wechsel von 16:8 h (3200 Lux) inkubiert. Um das Medium zu erneuern und dessen Mannitgehalt zu reduzieren, wurden sich bildende Kalli ca. alle 3 Wochen mit den Filterplättchen auf frischen Agar übertragen.

Kalli wurden, wenn sie eine Grösse von 2-3 mm erreicht hatten, auf Agarplatten mit demselben Medium übertragen und nach weiterem Wachstum auf 0,5 - 1 cm zur Animpfung einer Suspensionskultur in kinetinfreiem Medium verwendet. Acht Kalli wurden eine Woche in 90 ml Gamborg-B_5-Medium geschüttelt und mit dieser Rohkultur eine Kalluskultur auf G-B_5-Agar initiiert.

2.1.3.3. Anzucht einer Tabakzellsuspensionskultur Vergleich verschiedener Wuchsstoffe

Gewünscht war eine Tabakzellsuspension, deren Zellen zur Protoplastenisolierung geeignet waren.

Hierzu musste ein Medium gefunden werden, dessen Wuchsstoffzusammensetzung kein Längenwachstum der Zellen oder gar Differenzierung zur Folge hatte, so dass eine Zellkultur aus sphärischen Zellen gezüchtet werden konnte.

Als Nährmedium wurde Gamborg-B_5-Medium verwendet, da dieses Medium nach früheren Ergebnissen (Mertes, 1979) hinsichtlich Vermehrungsrate und Zellstoffwechselverträglichkeit für Tabak geeignet war.

Es wurden 5 verschiedene Wuchsstoffkombinationen untersucht:
1.) 2,4-D + NAA + Kinetin; 2.) 2,4-D + NAA; 3.) 2,4-D; 4.) NAA; 5.) Wuchsstoffrei.

Zur Erstellung einer Zellsuspension wurden unter sterilen Bedingungen ca. 6 ccm aus Protoplasten regeneriertes Kallusgewebe (2.1.3.2.) in einem 300-ml-EK mit 90 ml Nährmedium gegeben. Die Kolben wurden steril verschlossen und bei 28°C mit 100 upm im Dunkeln geschüttelt. Der Versuch wurde mit einer Wiederholung durchgeführt.

Zur Charakterisierung und quantitativen Erfassung der Zellmorphologie der verschiedenen Kulturansätze wurden von jedem Kolben je 2 Tropfen Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben und unter Verwendung eines Okularnetzmikrometers (10 x 10 mm, 20 x 20 Quadrate) in insgesamt 4 Wiederholungen die Anzahl Zellen verschiedener Zelltypen pro Netzmikrometer gezählt. Es wurden 3 Zelltypen unterschieden: 1.) sphärische Zellen; 2.) langgestreckte Zellen; 3.) Zellketten und verzweigte Formen. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Bonituren richtete sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zellkultur.
Die Bonitur wurde regelmässig dann durchgeführt, wenn die Kultur sich so weit vermehrt hatte (mindestens 60% Zellmasse in 100 ml Volumen), dass sie umgesetzt werden konnte.

Die Kulturen, deren Zellen hinsichtlich der Zellmorphologie am besten zur Weiterzucht geeignet waren, wurden drei Passagen über Agar (Gamborg-B_5-Agar mit der für die Kultur spezifischen Wuchsstoffkombination, vergl. Ergebnisse S. 44) unterzogen, um schnell wachsende Zellkulturen zu erhalten.

2.1.4. Inocula

2.1.4.1. Vermehrung und Reinigung des fd-Phagen (in Anlehnung an Hoffmann-Berling et al., 1963)

Zur Phagenvermehrung wurde ein Fermenter mit 10 l TIC-Medium mit 250 ml *E. coli* K_{12}-Übernachtkultur angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C, 5 l Luft/min und 300 upm bis 2 · 10^8 Bakt./ml vermehrt und der Phagen mit 10facher m.o.i. zugegeben. Vor der Phagenzugabe wurde der Rührer abgestellt. Der Fermenterinhalt wurde 4 h p.i. in sterile Gefässe abgelassen, die Bakterien-Phagensuspension bei 4°C aufbewahrt und eine Probe entnommen für eine erste Rohtiterbestimmung. Nach 12 h wurden die Bakterien im Westfalia Separator bei 1.400 upm sedimentiert und der Überstand nach Probenahme für eine zweite Rohtiterbestimmung mit konz. CH_3COOH auf einen pH-Wert von 3,8 eingestellt. Nach 20 h bei 4°C wurde der ausgefällte Phage 10 min bei 8.000 upm sedimentiert (GSA, Sorvall) und in PP-Tris-Puffer + 2 M Na_2CO_3, pH 8,6, suspendiert. Der Phage wurde in je 11 ml einer 31% (w/v) Lösung von CsCl in PP-Tris zentrifugiert (Spinco Sw Ti 40, 36.000 upm, 15°C, 36 h). Die resultierenden Gradienten wurden abgelassen und die vereinigten fd-Phagenbanden einer 2. Ultrazentrifugation (wie oben) unterzogen. Die zu ergänzende CsCl-Menge wurde refraktometrisch ermittelt. Die resultie-

renden Phagenbanden wurden vereinigt und 4 h gegen 1 M NaCl und danach 24 h gegen PP-Tris dialysiert. Die nicht phagentypischen Banden wurden bei beiden UZ-Reinigungen für einen Infektiositätstest aufbewahrt. Die Phagenkonzentration des gereinigten Präparates wurde anhand der Extinktion (Hoffmann-Berling et al., 1963 Ext. 260 nm 1 = 0,268 mg/ml) im Spektralphotometer bestimmt. Die Infektiosität wurde im Plaquetest bestimmt. Die gereinigte Phagensuspension wurde bei -18°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.1.4.2. Radioaktive Markierung der DNS in fd-Phagen

Der Phage wurde mit 10facher m.o.i. zu 900 ml Bakteriensuspension in TIC-Medium gegeben, welche zuvor unter Belüftung auf $2 \cdot 10^8$ Bakt./ml vermehrt worden war; 30 min p.i. wurde 1 µCi/ml (6-^{3}H)-Thymidin zugegeben (Suzuki u. Takebe, 1976). Die Vermehrung wurde 4 h p.i. beendet und der Phage gereinigt (s. 2.1.4.1.).

2.1.4.3. Isolierung von fd-DNS (variiert nach Gierer u. Schramm, 1956 und Hemleben et al., 1975)

Die DNS wurde aus dem Phagen isoliert, indem in ein gereinigtes Phagenpräparat 1% (w/v) SDS eingewogen und 5 min bei 37°C inkubiert wurde. Danach wurden auf 1 ml 30 mg p-Aminosalicylsäure-Na-Salz zugegeben und die Suspension nach weiterer Inkubation (5 min) mit 1 Volumen Chloroform-Kirby-Mix 20 min bei 37°C geschüttelt. Anschliessend wurde die Emulsion durch Zentrifugation (Christ Minifuge, 10', 1800 x g) gebrochen und die wässrige Phase nochmals mit 1 Volumen Chloroform-Kirby-Mix versetzt, 20 min geschüttelt und zentrifugiert. Die Phenolphasen wurden vereinigt und

mit 1/4 Volumen Tris-EDTA nachextrahiert. Die wässrigen Phasen wurden gesammelt und die DNS durch Zusatz von 2,5 Volumen 99% Äthanol (-18°C) und 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,5, gefällt. Das Präzipitat wurde sedimentiert (Christ Minifuge, 4°C, 2800 x g, 10 min) und in ca. 8 ml Tris-EDTA, pH 7,5, suspendiert.

Die Äthanolfällung wurde wiederholt, um restliches Phenol aus der DNS zu entfernen. Die DNS wurde bis zur weiteren Verwendung als Präzipitat in Äthanol bei -18°C aufbewahrt. Die Konzentration der in Puffer suspendierten DNS wurde spektralphotometrisch bestimmt (Ext. 258 nm 1,78 = $1 \cdot 10^{13}$ DNS-Moleküle/ml, berechnet nach Hoffmann-Berling et al., 1963). Als Kriterium der Reinheit wurde der Quotient Ext. 260 nm/Ext. 280 nm bestimmt. Bei reiner DNS beträgt dieser Wert 1,85 (Leber, 1977). Die relative Infektiosität der DNS wurde auf Sphäroblasten im Plaquetest (infective centers) ermittelt.

2.1.4.4. Isolierung von TMV-RNS (nach Adam, 1976)

100 mg TMV wurden mit 0,1 M Na-Acetatpuffer, pH 6, auf 10 ml aufgefüllt, mit 27,5 ml Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5, 7,9 ml 10% (w/v) SDS und 50 ml 80% (w/v) Phenol versetzt und 15 min bei 20°C geschüttelt. Die Emulsion wurde durch Zentrifugation (Christ Minifuge, 1800 x g, 10 min) gebrochen. Die wässrige Phase und die Phenolphase wurden mit je 1/2 Volumen 80% Phenol bzw. Tris-EDTA-Puffer nachextrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und die RNS durch Zugabe von 2,5 Volumen 99% Äthanol (-18°C) und 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,5, gefällt. Die RNS wurde sedimentiert (Christ Minifuge,

4°C, 2.800 g, 10 min) und in 20 ml Tris-EDTA-Puffer suspendiert. Die Äthanolfällung wurde dreimal wiederholt und die RNS vor der 3. Fällung portioniert und bis zur weiteren Verwendung als Präzipitat in Äthanol bei -18°C aufbewahrt. Die Konzentration der suspendierten RNS wurde spektralphotometrisch bestimmt (Hopkins u. Sinsheimer, 1955 : Ext. 260 nm 23 = 1 mg(ml) und die Infektiosität im Biotest auf *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. geprüft.

2.2. Protoplastentechnik

2.2.1. Protoplastenisolierung aus Tabakblättern

Die Protoplasten wurden aus nicht voll expandierten Blättern von 45-60 Tage (ab Aussaat) alten Tabakpflanzen nach einer der beiden unter beschriebenen Methoden isoliert.

a) Zwei-Schritt-Methode

Die Protoplasten wurden in Anlehnung an die von Takebe beschriebenen Methoden (Takebe, Otsuki u. Aoki, 1968; Mertes, 1979) unter sterilen Bedingungen isoliert.

Nach Ergebnissen verschiedener Autoren (Sarkar et al., 1974; Okuno u. Furusawa, 1978) ist bei Infektionen von Protoplasten mit freier Nukleinsäure der Infektionserfolg abhängig von der Wahl des Plasmolytikums bei der Protoplastenisolierung. Daher wurden Tabakprotoplasten unter verschiedenen Bedingungen isoliert:

1.) 0,7 M Mannit; 2.) 0,5 M Mannit; 3.) 0,5 M Mannit und 0,1 µg/ml Cycloheximid nach Okuno u. Furusawa; 4.) von Sarkar modifiziertes Plasmolytikum nach Meyer aus 2,5% KCl und 1% $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$. Für die Herstellung der Enzymlösungen wurden jeweils 1% Macerocym bzw. 1% Cellulase in dem gewählten Plasmolytikum gelöst.

b) Ein-Schritt-Methode

Die Blätter wurden oberflächensterilisiert (30 sec, 70% Äthanol, 20 min 0,7% Calciumhypochlorit) und mit sterilem aqua dest. gewaschen (3 x 5 min). Zur Entfernung der Epidermis wurde die Blattunterseite mit sterilem Carborundum bestäubt und die Epidermis mit einem Pinsel vorsichtig abgerieben (Beier u. Bruening, 1975). Die Blätter wurden anschliessend in sterilem aqua dest. gewaschen, mit einem Skalpell quer zur Mittelrippe halbiert sowie die Mittelrippe entfernt. Die nochmals mit sterilem aqua dest. nachgewaschenen Blattstücke wurden mit der Unterseite nach unten 45 min auf einer 0,5 M Mannitlösung inkubiert und schliesslich auf ein Enzymgemisch (1.7.) übertragen. Nach 2 - 3 h Inkubation im Schüttelwasserbad bei 30°C und 40 Schüben/min waren die Blätter bis auf die Cuticula vollständig dissoziiert. Die entstandene Suspension wurde durch ein Polyesternetz (0,1 mm Maschenweite) gegeben und das protoplastenhaltige Filtrat in flachbödigen Zentrifugenbechern sedimentiert (Christ Minifuge, 3 min, 25°C, 30 x g). Zur Entfernung der Enzymlösung wurde das Sediment 3 mal in 0,5 M Mannit gewaschen, d.h. resuspendiert und zentrifugiert.

2.2.2. Protoplastenisolierung aus einer Sojazellsuspension

Die Protoplasten wurden in einem Enzymgemisch nach Negrutiu (1.7.) aus der Zellsuspension isoliert (Mertes u. Sander, 1981; Mertes, 1979).

Für Versuche zur Infektion mit TMV-RNS wurden die Protoplasten in 0,5 M Medium mit einem Zusatz von 0,1 µg/ml Cycloheximid isoliert.

2.2.3. Protoplastenisolierung aus einer Tabakzellsuspension

Die Protoplasten wurden 4 - 6 Tage nach dem Umsetzen aus den Zellen und Zellverbänden zweier Tabakzellsuspensionen isoliert. Die beiden Kulturen unterschieden sich im Auxingehalt des Mediums: eine Kultur wurde in G-B_5-Standardmedium mit 2,4-D, die andere in G-B_5 mit 2,4-D + NAA herangezogen. Die Protoplasten wurden nach der für die Sojazellsuspension beschriebenen Ein-Schritt-Methode (Negrutiu, Beetfink u. Jakobs, 1975; Mertes, 1979) isoliert. Ausser der Standardmolarität des Mannits von 0,7 M wurde eine niedere Konzentration von 0,5 M untersucht. Der Einfluss von Kaliumdextransulfat (KDS) auf die Protoplastenqualität wurde ebenfalls getestet. Um eine Aussage über die Lebensdauer und Stabilität der Protoplasten machen zu können wurden Protoplasten in Agarkulturmedium bei 28°C und 1000 Lux Dauerlicht inkubiert (Mertes, 1979).

2.2.4. Beurteilung und Berechnung der Protoplastenausbeute

Die gewaschenen Protoplasten wurden in einem definierten Volumen des gewählten Plasmolytikums aufgenommen und in einer Thoma-Zählkammer gezählt. Protoplasten wurden als physiologisch intakt bezeichnet wenn sie eine glatte Oberfläche hatten und kreisrund, d.h. osmotisch aktiv waren. Bei Protoplasten aus Blattmaterial war die Regelmässigkeit der Chloroplastenanordnung ein weiteres Kriterium. Der Anteil physiologisch intakter Protoplasten wurde auf die Menge eingesetzten Blattmaterials bzw. Zellsuspension bezogen und als PP/g Blattgewebe bzw. als PP/ml Zellsuspension ausgedrückt.

2.3. Infektionsversuche

2.3.1. Infektionsversuche mit TMV-RNS und Protoplasten

A) Infektionsversuche mit Protoplasten aus Tabakblättern

Protoplasten wurden aus Tabakblättern isoliert (2.2.1.a.) und nach einer der unten beschriebenen Methoden in allen Experimenten mit 1 µg/ml TMV-RNS infiziert.

Die infizierten und gewaschenen Protoplasten wurden unabhängig von der Infektionsmethode unter konstanten Bedingungen weiterinkubiert. Hierzu wurden sie in NT-Medium ohne Wuchsstoffe (0,7 M Mannit) aufgenommen, so dass eine PP-Konzentration von $1 - 2 \cdot 10^5$ PP/ml vorlag und 38 h bei 28°C und 1000 Lux Dauerlicht zur TMV-Synthese gehalten.

Infektionsmethoden:

1.) Methode nach Sarkar in Mannit (Sarkar et al., 1974)

Die in 0,7 M Mannit isolierten Protoplasten wurden in einem alkalischen Inokulationsmedium mit RNS, 0,8 M Mannit, 0,1 M Saccharose, 0,1 M Glycin, 0,1 M NaCl und $2 \cdot 10^{-2}$ M $MgCl_2$, pH 9,0, suspendiert. Die Protoplastenkonzentration betrug $1 - 2 \cdot 10^5$ PP/ml. Nach 20 min Inkubation bei 30°C und ca. 1000 Lux Lichtintensität wurden die Protoplasten sedimentiert und zweimal mit 0,7 M Mannit gewaschen zur Entfernung des Inoculums.

2.) Methode nach Sarkar in Salzplasmolytikum (Sarkar et al., 1974)

Die in Salzlösung isolierten Protoplasten wurden in einem alkalischen Inokulationsmedium mit RNS, 2,5% KCl, 1% $MgCl_2$ und 0,1 M Glycin, pH 9,0, suspendiert. Protoplastenkonzentration und Inkubation wurden wie bei Methode 1 gewählt. Als Waschlösung wurde eine Salzlösung aus 2,5% KCl und 1% $MgCl_2$ verwendet.

3.) Methode nach Okuno und Furusawa (1978)

a) Methode ohne Cycloheximid

Die in 0,5 M Mannit isolierten Protoplasten wurden in 6°C-kaltem 0,5 M Mannit so suspendiert, dass die Konzentration $1 - 2 \cdot 10^5$ PP/ml betrug. Die Nukleinsäure, 2 µg/ml PLO und 1 mM $CaCl_2$ wurden im gleichen Volumen kaltem 40 mM K-Citratpuffer, 0,5 M Mannit, pH 4,7, aufgenommen und 10 min vorinkubiert. Anschliessend wurden beide Suspensionen gemischt und zur Infektion 15 min bei 6°C und ca. 600 Lux inkubiert. Die Protoplasten wurden sedimentiert und zweimal mit 0,7 M Mannit + 10 mM $CaCl_2$ gewaschen.

b) Methode mit Cycloheximid

Für die Infektion wurden Protoplasten verwendet, die mit einem Zusatz von 0,1 µg/ml Cycloheximid isoliert worden waren. Die Infektion wurde durchgeführt wie unter a) beschrieben. Bei einem Versuchsansatz wurde ein Vergleich durchgeführt zwischen einer Infektion im Glasgefäss bzw. im Kunststoffgefäss, da RNS an Glas leichter adsorbieren soll als an Kunststoff.

4.) Methode nach Takebe für DNS-Infektion
(Suzuki u. Takebe, 1976)

Die in 0,5 M Mannit isolierten Protoplasten wurden so in 5 ml 0,5 M Mannit aufgenommen, dass die Protoplastenkonzentration $1 \cdot 10^6$ PP/ml betrug. In einem gleichen Volumen 0,5 M Mannit wurden 5 µg/ml PLO mit der TMV-RNS 10 min bei 4°C vorinkubiert. Anschliessend wurden beide Suspensionen gemischt, 5 mM $ZnSO_4$ zugegeben und 40 min bei 28°C und ca. 1000 Lux inkubiert. Die Protoplasten wurden sedimentiert und zweimal mit 0,7 M Mannit + 10 mM $CaCl_2$ gewaschen.

B) Infektionsversuche mit Protoplasten aus einer Sojazellsuspension

Aus einer Sojazellsuspension wurden 4-5 Tage nach Umsetzen der Kultur in einem Enzymgemisch mit 0,25 M Mannit und 0,25 M Sorbit als Plasmolytikum sowie 0,1 µg/ml Cycloheximid Protoplasten isoliert und nach der Methode von Okuno und Furusawa (s. 3a) mit TMV-RNS behandelt. Die Protoplastenkonzentration betrug $5 \cdot 10^5$ PP/ml. Die nach der Infektion gewaschenen Protoplasten wurden dann mit G-B_5-Medium wieder auf dieselbe Konzentration eingestellt und 38 h bei 28°C im Dunkeln inkubiert.

2.3.1.1. Nachweis der Infektiosität der TMV-Nachfolgepartikeln im Ganzblatt-Biotest

Bei den Infektionsversuchen (2.3.1.) wurden 0 h, 12 h, 21 h und 38 h nach Beendigung der Infektion Proben der infizierten Protoplasten genommen und bei -18°C eingefroren (Mertes u. Sander, 1981). Zum Nachweis der Infektiosität in den Proben wurden diese im gefrorenen Zustand von Hand gemörsert, in 0,1 M Soerensen Phosphatpuffer, pH 8,0 aufgenommen und 300 µl-Aliquoten mit aufgerauhten Glasspateln auf mit Carborundum bestäubte Xanthi-Blätter aufgetragen. Je Zeitwert-Probe wurden 15 Blätter auf 3 Pflanzen beimpft und diese nach dem Beimpfen mit Wasser abgespült und zur Entwicklung von Läsionen inkubiert (23°C, ca. 60% RLF, 10000-40000 Lux Tageslicht).

Als Mass für den Infektionserfolg einer Probe wurde die durchschnittliche Anzahl Läsionen pro Blatt ermittelt. Als Kontrolle des Testsystems wurde bei jedem Biotest eine TMV-Verdünnungsreihe sowie steriler Puffer aufgetragen.

2.3.1.2. Nachweis von TMV-Protein in mit TMV-RNS infizierten Protoplasten durch Immunfluoreszenz

Aliquoten von 5 ml infizierten Protoplasten wurden 0 h, 12 h, 21 h und 38 h p.i. für eine Anfärbung mit FITC-markierten Antikörpern aus dem Inkubationsmedium entnommen und durch Zentrifugation auf ca. 1/20 des Volumens eingeengt (Christ Minifuge, 3 min, 20°C, 30 x g). Ein 2 mm grosser Tropfen der eingeengten Protoplastensuspension wurde auf einem mit Eiweiss-Glycerin dünn bestrichenen Objektträger mit einem Föhn schnell getrocknet und 30 min in Aceton fixiert (Otsuki u. Takebe, 1969, Mertes, 1979).

Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Präparate in Feuchtigkeitskammern je 1 h bei 37°C mit TMV-spezifischen Antikörpern (1.3.1.) und, nach einstündigem Waschen in PBS, mit FITC-konjugierten γ-Globulinen gegen Kaninchenserum gefärbt. Nicht absorbierte γ-Globuline wurden durch Waschen in PBS (1 h) entfernt. Die Auswertung erfolgte unter einem Zeiss-Mikroskop mit Fluoreszenzaufsatz. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Protoplasten mitbehandelt. Für einen quantitativen Vergleich der verschiedenen Versuchsansätze wurde ein Okularnetzmikrometer (10 x 10 mm, 20 x 20 Quadrate, 17 mm Ø) verwendet und für jede Probe in 12 unterschiedlichen Ausschnitten jeweils die Protoplasten innerhalb des Netzmikrometers gezählt. Die Anzahl der Protoplasten mit spezifischer Fluoreszenz wurde in Prozent der Gesamtzahl der gezählten Protoplasten ausgedrückt.

2.3.2. Infektionsversuche mit fd-Phage und Protoplasten

a) Infektionsversuche mit PP aus Tabakblättern

Die in 0,5 M Mannit isolierten Protoplasten wurden in citratgepuffertem Mannit suspendiert. Die Protoplastenkonzentration betrug $1 - 2 \cdot 10^5$ PP/ml. Die fd-Phagenpartikeln wurden mit einer m.o.i. von 100 zugegeben d.h. $1 - 2 \cdot 10^7$ pfu/ml. Nach 12 min Inkubation bei 28°C und ca. 1000 Lux wurden die Protoplasten zentrifugiert (Christ Minifuge, 3 min, 25°C, 30 x g), aufgewirbelt und erneut zentrifugiert (Mielicke, 1975). Anschliessend wurden die Protoplasten zweimal mit 0,7 M Mannit + 10 mM $CaCl_2$ gewaschen, dann in NT-Nährmedium (0,7 M Mannit) ohne Wuchsstoffe aufgenommen und 38 h bzw. 48 h bei 28°C und 1000 Lux inkubiert.

b) Infektionsversuche mit Protoplasten aus einer Sojazellsuspension

Bis auf die Protoplastenkonzentration wurde die Infektion wie bei Tabakprotoplasten durchgeführt. Sie betrug $5 \cdot 10^5$ PP/ml, entsprechend wurden $5 \cdot 10^7$ pfu/ml fd-Phagen zugegeben (m.o.i. = 100). Zusätzlich zur Mannit-Standardwaschlösung wurde eine Waschlösung mit gepuffertem Mannit, pH 9,6, geprüft. Als Nährmedium wurde G-B_5-Medium (0,7 M Mannit) verwendet. Die Inkubationsdauer betrug 38 h bei 28°C im Dunkeln.

2.3.3. Infektionsversuche mit fd-DNS und Protoplasten aus Tabakblättern

Protoplasten wurden in 0,5 M Mannit isoliert und nach einer von Takebe (Suzuki und Takebe, 1976) beschriebenen Methode infiziert.

Die Protoplasten wurden in 5 ml 0,5 M Mannit mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ PP/ml suspendiert. In einem gleichen Volumen 0,5 M Mannit wurden 5 µg/ml PLO und $4{,}4 \cdot 10^{12}$ DNS-Moleküle/ml (m.o.i. = $2{,}2 \cdot 10^6$ nach Umrechnung der Angaben von Takebe) 10 min bei 4°C voringkubiert. Anschliessend wurden beide Suspensionen gemischt, 5 mM $ZnSO_4$ zugegeben und 40 min bei 28°C und ca. 1000 Lux inkubiert. Die Protoplasten wurden sedimentiert und zweimal mit 0,7 M Mannit + 10 mM $CaCl_2$ gewaschen zur Entfernung des Inoculums. Zur weiteren Inkubation wurden die Protoplasten mit NT-Medium (0,7 M Mannit, ohne Wuchsstoffe) auf $1 \cdot 10^5$ PP/ml verdünnt und 38 h bei 28°C und 1000 Lux gehalten.

Sollten Protoplasten zur autoradiographischen Lokalisierung der fd-DNS mit radioaktiv markierter DNS infiziert werden, geschah dies nach der gleichen Infektionsmethode, jedoch wurden die Protoplasten mit (6-^{3}H)-Thymidin-markierter fd-DNS der Aktivität $3 \cdot 10^{6}$ dpm/5 ml inkubiert (Markierung s. 2.1.4.1.). Die infizierten und gewaschenen Protoplasten wurden in 10 ml 0,5 M Mannit suspendiert und die Aktivität von Protoplasten und Waschwasser in Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt (100 µl Probe in 10 ml Insta-Gel). Ca. 2-3 h p.i. wurden die Protoplasten für die Autoradiographie fixiert.

2.3.3.1. Nachweis von fd-Nachfolgepartikeln im Plaquetest

Bei den Infektionsversuchen (2.3.2., 2.3.3.) wurden 0 h, 12 h, 21 h und 38 h p.i. Proben der infizierten Protoplasten genommen. Bei fd-Phagen-Infektionen wurden jeweils 10 ml, bei fd-DNS-Infektion 6 ml Protoplastensuspension zentrifugiert und sowohl Überstand als auch Protoplasten-Sediment getrennt bei -18°C aufbewahrt.

Für den Plaquetest wurden die Protoplasten in gefrorenem Zustand gemörsert und in 0,4 ml Tris-EDTA, pH 7,5, aufgenommen. Die Überstände wurden aufgetaut. Von diesen Suspensionen wurde jeweils 0,1 ml in 2,5 ml TIC-Weichagar (0,6% Agar, 45°C) pipettiert, 0,2 ml Indikator-Bakterien (*E. coli* K_{12}Hfr C 6) aus einer 12 h-Kultur zugegeben und die Weichagar-Suspension auf eine TIC-Hartagarunterlage (1% Agar) gegossen. Die Platten wurden 12 - 18 h bei 37°C inkubiert. Je Zeitwert-Probe wurden 3 Platten angesetzt. Als Mass für den Infektionserfolg wurde die durchschnittliche Anzahl pfu/ml ermittelt.

Zur Kontrolle des Testsystems wurde bei jedem Plaquetest eine fd-Verdünnungsreihe getestet.
Von jedem Zeitwert sowie von einem fd-Kontrollpräparat wurde zur Prüfung der Funktionstüchtigkeit des Testsystems ein Tropftest gemacht, d.h. 10 µl der Probe wurden unverdünnt auf eine TIC-Agarplatte mit Indikatorbakterien getropft und 12 - 18 h zur Plaquebildung bei 37°C inkubiert.

2.3.3.2. Test auf fd-Protein in Tabakprotoplasten durch Immunfluoreszenz

Aliquoten von 6 ml fd-DNS-infizierten Protoplasten wurden 0 h, 12 h, 21 h und 38 h p.i. für eine Anfärbung mit FITC-markierten Antikörpern aus dem Inkubationsmedium entnommen. Die Protoplastensuspension wurde durch Zentrifugation auf ca. 1/20 des Volumens eingeengt (Christ Minifuge, 3 min, 20°C, 30 x g) und anschliessend nach der gleichen Methode fixiert und mit fd-Antiserum sowie FITC-konjugierten γ-Globulinen gegen Kaninchenantiserum behandelt, wie sie unter 2.3.1.2. für den Nachweis von TMV-Protein durch Immunfluoreszenz beschrieben ist. Zusätzlich wurden in Abwandlung dieser Methode die eingeengten Protoplasten in 0,5% Glutaraldehyd suspendiert und 30 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS durch Resuspension (je 5 min) und Zentrifugation (Christ Minifuge, je 3 min, 20°C, 30 x g) wurden pro Sediment 2 Tropfen fd-spezifischer γ-Globuline mit einer Pasteurpipette zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C im Zentrifugenglas und dreimaligem Waschen in PBS, pH 7,2 (s.o.), wurden pro Protoplastensediment 2 Tropfen 1 : 10 verdünnte FITC-konjugierte γ-Globuline gegen Kaninchenserum aufgetropft. Die Protoplasten wurden

1 h bei 37°C im Zentrifugenglas inkubiert, dreimal mit PBS, pH 7,2, gewaschen (s.o.), in 3 ml PBS aufgenommen und im Zeiss-Mikroskop mit Fluoreszenzaufsatz ausgewertet.

Zur Kontrolle wurden bei beiden Methoden nicht fd-DNS-behandelte Protoplasten mitgefärbt.

2.3.3.3. Lokalisierung von fd-DNS in Tabakprotoplasten durch Autoradiographie (nach Schwarz u. Thilo, 1983, im Druck)

1.) Fixierung und Einbettung

Die Protoplasten wurden 30 min in 2,5% Glutaraldehyd fixiert, über Nacht in Phosphatpuffer aufgenommen, sedimentiert und in einem Tropfen 2,5% Agar (45°C) suspendiert. Nach dem Erkalten wurde der protoplastenhaltige Agar in ca. 1 mm grosse Blöcke geschnitten und eine Stunde in Osmium Tetroxid nachfixiert. Die Präparate wurden in einer Alkoholreihe dehydriert, mit Uranylacetat gefärbt, in Epon eingebettet und mit einem Ultramikrotom geschnitten.

Die Durchführung dieser Schnitte verdanke ich Frau Kleih im Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen.

2.) Aufziehen der photographischen Emulsion, Entwicklung und Fixierung

Die autoradiographischen Prozesse wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Heinz Schwarz am Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, durchgeführt. Die Expositionszeit der Präparate betrug 5 Wochen.

2.3.4. Infektionsversuche mit TMV und Zellen einer Tabakzellsuspensionskultur

Das Ziel dieser Versuche war die Erstellung eines Infektionssystems, dessen Handhabung einfach und zeitsparend ist. Eine Zellsuspensionskultur bietet Gewähr für ein gleichbleibendes, steriles Ausgangsmaterial. Die Weiterkultivierung des infizierten Materials kann routinemässig entsprechend dem Ausgangsmaterial durchgeführt werden und erfordert keine speziellen Nährmedien und Kulturbedingungen wie sie z.B. bei der Isolierung und Infektion von Protoplasten notwendig sind. Soll der Verlauf einer Virusinfektion lediglich quantitativ erfasst werden ohne Erfassung einzelner Syntheseschritte, wäre ein zeitsparendes Infektionssystem von Vorteil.

Die Versuche wurden 4 Tage nach dem Umsetzen mit einer kontinuierlichen Tabakzellsuspension durchgeführt. Das Zellmaterial wurde zentrifugiert (30 ml Zellsuspension, Christ Minifuge, 3 min, 28°C, 20 - 25 x g) und 100 µg/ml TMV (Wu u. Murakishi, 1979) zugegeben. Das Zell-Virus-Gemisch wurde 20 sec mit einem Vortexgerät, Stufe 3, behandelt und dreimal mit Kulturmedium durch Zentrifugation und Resuspension gewaschen. Mit 30 ml infizierter Kultur wurden 90 ml Kulturmedium angeimpft und die bei Standardbedingungen (2.1.3.3.) kultivierte Kultur nach 5 Tagen ca. 1 : 10 verdünnt. In einem Experiment wurde die Kultur bereits nach 3 Tagen verdünnt.

2.3.4.1. Nachweis der Infektiosität der TMV-Nachfolgepartikeln im Halbblatt-Biotest

Bei den Infektionsversuchen (2.3.4.) wurden 0 h, 3 Tage und 5 Tage nach der Infektion sowie 3 Tage und

5 Tage nach jeder Kulturverdünnung Proben der infizierten Zellen genommen und eingefroren (nach Mertes u. Sander, 1981: Probenahme TMV-infizierter Protoplasten). Zum Nachweis der Infektiosität der Proben wurde das gefrorene Zellmaterial gemörsert, in 0,1 M Soerensen Phosphatpuffer, pH 8,0, aufgenommen und 200 µl-Aliquoten mit aufgerauhten Glasspateln auf jeweils einer Blatthälfte mit Carborundum bestäubter Xanthi-Blätter aufgetragen. Die den Proben gegenüberliegenden Blatthälften wurden mit einer TMV-Standardkonzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ g TMV/ml beimpft (Mertes, 1979). Je Zeitwert-Probe wurden 15 Blatthälften auf 3 Pflanzen behandelt.

Als Mass für den Infektionserfolg wurde die Summe der Läsionenzahlen auf der Probenblatthälfte als Prozent der Summe der Läsionenzahlen auf der Standardblatthälfte ausgedrückt (Mertes, 1979).

2.4. Langfristige Konservierung pflanzlicher Zellsuspensionskulturen durch Einfrieren

Das Einfrieren lebenden Materials zum Zwecke der Konservierung und zum Schutz vor schädigenden äusseren Einflüssen wie Kontamination oder Versagen der technischen Einrichtungen wird bisher nur mit tierischem Material routinemässig durchgeführt. Für den Umgang mit pflanzlichen Zellkulturen, verbunden mit regelmässigem Umsetzen der Kultur und Einhaltung genauester Kulturbedingungen, würde die Möglichkeit, das Material durch Einfrieren und folgender Rekultivierung erhalten zu können, ebenfalls eine wünschenswerte Erleichterung darstellen.

Experimente wurden mit einer kontinuierlichen Sojazellsuspensionskultur durchgeführt. Die Zellsuspension wurde 4 Tage nach dem Umsetzen in sterile 2 ml-Polypropylenampullen abgefüllt, auf Eis gesetzt und verschiedene Kälteschutzmittel zugegeben. Die Volumina von Zellsuspension sowie Kälteschutzmitteln wurden so gewählt, dass ein Gesamtvolumen von 1,6 ml nicht überschritten wurde. Die Zugabe der Kälteschutzmittel erfolgte schrittweise über eine Stunde hinweg in drei Aliquoten, wobei folgende Kombinationen geprüft wurden (Endkonzentration):

12% Saccharose
1 M Prolin
10% DMSO
5% DMSO + 5% Glycerin + 1 M Prolin
12% Saccharose + 1 M Prolin
12% Saccharose + 10% DMSO
12% Saccharose + 1 M Prolin + 12% Sojapepton
12% Saccharose + 1 M Prolin + 6% RSA
12% Saccharose + 1 M Prolin + 12% PVP
12% Saccharose + 10% DMSO + 12% Sojapepton
12% Saccharose + 10% DMSO + 6% RSA
12% Saccharose + 10% DMSO + 12% PVP
12% Saccharose + 10% DMSO + 1 M Prolin

Nach einer weiteren Stunde auf Eis wurden die Zellen eingefroren. Hierbei wurden folgende Möglichkeiten untersucht:

a) programmiertes Einfrieren im Einfrierautomat R 201 (Messer Griesheim)

Die Gefrierrate betrug 1°C/min, wobei die Temperatur bei -30°C für 30 min gehalten wurde (Withers u. Kind, 1979). Die Gefrierrate wurde kontinuierlich in einer Referenzampulle gemessen.

b) Einfrieren in einer Styropor-Box mit einer Wandstärke von 5 cm im -70°C-Tiefkühlschrank.

Hiermit soll eine Gefrierrate von ca. 1°C/min erzielt werden (Dietzgen, 1981).

c) Einfrieren in einer Styropor-Box mit einer Wandstärke von 3 cm im -30°C-Tiefkühlschrank.

In jedem Fall wurden die Zellen im Anschluss an das Einfrieren in flüssigen Stickstoff überführt.

Nach ca. 2 Wochen wurden die Zellen im 37°C-Wasserbad schnell aufgetaut. Die Zellen wurden entweder sofort auf Nähragar gegeben (Withers, 1980) oder vorher dreimal mit Nährmedium gewaschen, um die teilweise toxischen Kälteschutzmittel herauszuverdünnen.

Hierbei wurden die Zellen nicht zentrifugiert, sondern vorsichtig aufgewirbelt und passiv wieder absitzen gelassen. Nähragar und Inkubationsbedingungen entsprachen dem für die Sojazellkultur üblichen Standard (2.1.1., Mertes, 1979).

Die Toxidität der Kälteschutzmittel wurde überprüft, indem Aliquoten der Zellsuspension unter Zusatz je eines der Kälteschutzmittel 2 Stunden auf Eis gehalten wurden, jedoch anschliessend nicht eingefroren, sondern sofort auf Gamborg-B_5-Agar überführt und bei 28°C im Dunkeln (2.1.1.) zur Überprüfung von Zellwachstum und -vermehrung inkubiert wurden.

III E R G E B N I S S E

3.1. Phagenausbeute bei der Vermehrung und Reinigung des fd-Phagen

Die zur Infektion der Bakterien eingesetzte Phagenmenge betrug $3 \cdot 10^{13}$ pfu/10 l. Im Pohlysat waren $3 \cdot 10^{15}$ i.c./10 l enthalten. Nach der Zentrifugation im Westfalia Separator waren nur noch $3,9 \cdot 10^{14}$ i.c./10 l vorhanden. Möglicherweise war durch zu starke mechanische Beanspruchung des Phagen ein Infektions-Verlust eingetreten. Nach der Reinigung des Phagen lagen 13 ml Phagensuspension vor mit insgesamt $3,7 \cdot 10^{14}$ pfu, d.i. das 12,3fache der eingesetzten Phagenmenge.

3.2. fd-DNS-Ausbeute und -Infektiosität

Eingesetzt wurden 12 ml fd-Phage mit $3,48 \cdot 10^{14}$ pfu und Ext. 260 nm = 13,2, d.i. 42 mg/12 ml. Nach der Reinigung standen 8 ml DNS-Suspension mit $2,79 \cdot 10^{13}$ DNS-Moleküle/ml, d.i. 0,51 mg DNS/8 ml zur Verfügung. Bei einem DNS-Gehalt des Phagen von 12,2% ist dies eine Ausbeute von 10%. Der Quotient Ext. 260 nm/ Ext. 280 nm betrug 1,79 (2.1.4.3.). Auf Sphäroblasten zeigten 10^8 Moleküle/ml eine Infektiosität von $6,86 \cdot 10^3$ i.c./ml.

3.2.1. Radioaktive Markierung der fd-DNS

Die zur Infektion der Bakterien eingesetzte Phagenmenge betrug $1,8 \cdot 10^{12}$ pfu, die eingesetzte Aktivität betrug 900 µCi (2.1.4.2.). Das gereinigte Phagenpräparat hatte eine Aktivität von 17 µCi und eine Infektiosität von $9,7 \cdot 10^{13}$ pfu in 5 ml Volumen, d.i. eine Vermehrung um den Faktor 54 (Ext. 260 nm = 8,8, d.i. 11,8 mg/5 ml).

Nach der DNS-Reinigung lagen in 4 ml Volumen $7 \cdot 10^{13}$ Moleküle, d.i. 0,16 mg vor. Dies entspricht einer Ausbeute von 11,2%. Die Aktivität der Gesamt-DNS betrug 12 µCi, der Quotient Ext. 260 nm/Ext. 280 nm betrug 1,75.

3.3. TMV-RNS-Ausbeute und -Infektiosität

Aus 100 mg TMV wurden 3,3 mg RNS isoliert, dies entspricht einer Ausbeute von 58,9% bei einem RNS-Gehalt des Virus von 5,6%. Im Biotest auf Blättern von *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. hatten 150 µg RNS/0,3 ml eine durchschnittliche Infektiosität von 128,3 Läsionen/Blatt (Durchschnitt von 10 beimpften Blättern)

3.4. Anzucht von Tabakkallusgewebe

a) Anzucht aus Keimlingen

Von den oberflächensterilisierten Samen waren nach 12 Tagen ca. 25% und nach 18 Tagen 62% gekeimt. Die Keimlinge wurden nach 25 Tagen zerkleinert und zur Kallusbildung auf Agar in Zellkulturplatten übertragen. Nach ca. 1 Monat erreichten die Kalli einen Durchmesser von ca. 5 mm und konnten auf neue Agarplatten umgesetzt werden, wo sie innerhalb 2 1/2 Wochen einen Durchmesser von ca. 1 cm erreichten. Damit stand die zur Erstellung einer Zellkultur notwendige Kallusquantität nach 2 1/2 Monaten zur Verfügung.

b) Anzucht aus Protoplasten

Kallusbildung aus Protoplasten war nach 10 Tagen erkennbar. Die Kalli wurden mit den Filterplättchen ca. alle 3 Wochen auf frisches Agarmedium übertragen,

wobei der Mannitgehalt stufenweise reduziert wurde (0,5 M - 0,25 M - 0,05 M - Mannitfrei). Insgesamt 2,5 Monate nach der Aussaat der Protoplasten wurden die Kalli einzeln auf Agarmedium in Petrischalen gesetzt und erreichten nach 1 Monat einen Durchmesser von 1,5 cm. Die zur Erstellung einer Zellkultur notwendigen Kallusquantität stand hiermit nach 3 1/2 Monaten zur Verfügung.

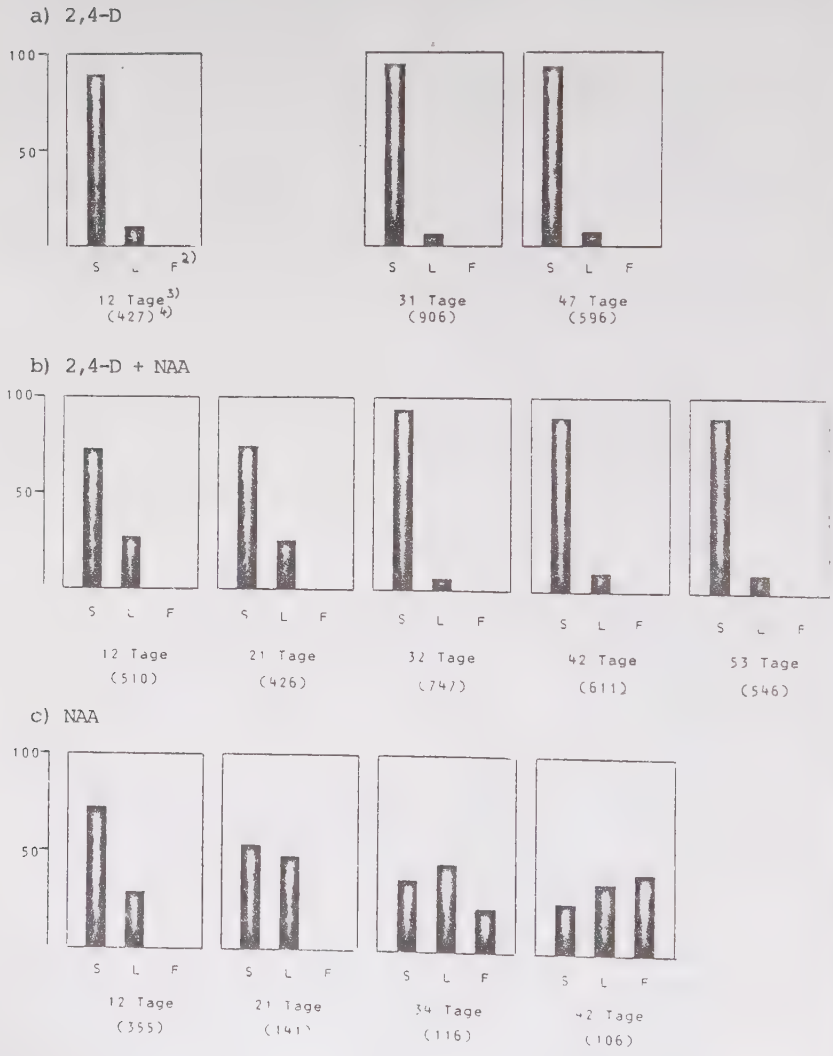
3.5. Vergleich des Einflusses verschiedener Wuchsstoffe auf das Wachstum einer Tabakzellsuspension

Zur Anzucht einer Kultur, deren Zellen eine sphärische Form haben sollen, waren die kinetinfreien Medien mit 2,4-D bzw. 2,4-D + NAA als Auxine am besten geeignet. Bereits nach 31 Tagen erreichten die sphärischen Zellen einen Anteil von 92 - 94% an der Gesamtzellzahl in der Kultur (Abb. 1a und 1b).

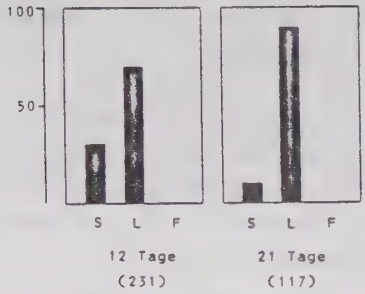
Die Bildung langgestreckter Zellformen war in den kinetinfreien Medien ohne 2,4-D begünstigt; bei Zugabe von NAA als Auxin nahm der Anteil langgestreckter Zellformen innerhalb 42 Tagen von 30% auf 75% zu, wobei 39% dieser Form sogar vielzellig waren (Abb. 1c); ohne jegliche Auxinzugabe betrug der Anteil langgestreckter Zellen schon nach 12 Tagen 70% (Abb. 1d). Wurde dem Medium noch Kinetin zugefügt, regenerierten die Zellen in Flüssigkultur zu rudimentären Pflänzchen, die auf Agar gesetzt werden konnten (Abb. 1e). Hierzu wurde Medium derselben Zusammensetzung mit 0,25% Agar verfestigt, in Reagenzgläser gefüllt und die austreibenden Kalli auf dem Agar bei 28°C vor einer Lichtquelle mit 1000 Lux gehalten. Nach 11 Tagen waren differenzierte grüne Pflänzchen herangewachsen, wobei an der

Abb. 1 Anteil dreier Zelltypen (in %)[1] in Tabakzellsuspensionen bei variierter Wuchsstoffzusammensetzung in Abhängigkeit von der Kulturdauer

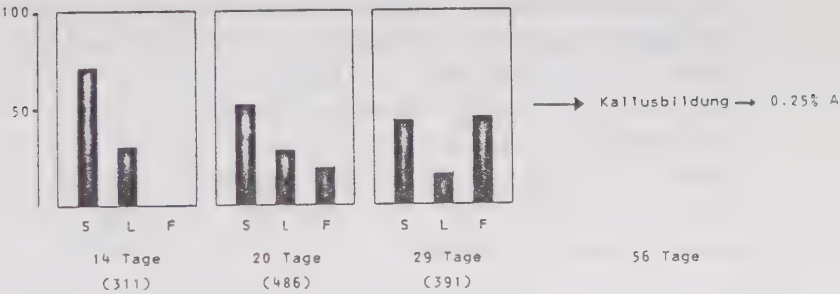
Kulturmedium: Gamborg-B_5-Medium mit Zusatz von:



d) ohne Wuchsstoffe



e) 2,4-D + NAA + Kinetin



1) Jeder Wert repräsentiert die relative Anzahl der Zellen eines Typs (in %) die in je 4 Zählungen einer Zellkultur festgestellt wurden (s. 2.1.3.3.).
2) S = sphärisch
   L = langgestreckt
   F = Zellketten
3) Kulturdauer
4) Grundgesamtheit der bonitierten Zellen aller Typen (= 100%) in der Suspension

Stärke der Chlorophyllbildung ein deutlicher Lichtgradient erkennbar war, da die Pflänzchen in unterschiedlichem Abstand zur Lichtquelle standen.

Da zur Protoplastenisolierung eine Zellkultur mit vorwiegend sphärischen Zellen gewünscht war, wurden nur die Tabakzellkulturen in $G\text{-}B_5$ + 2,4-D und $G\text{-}B_5$ + 2,4-D + NAA weitergezogen und ihre Eigenschaft Protoplasten aus ihnen isolieren zu können, getestet.

Die Kulturen wurden nach dem Animpfen des Mediums mit Kallusgewebe nach 9 - 12 Tagen umgesetzt. Um eine schneller und besonders fein wachsende Kultur zu erhalten, wurde eine Passage über Agar durchgeführt, d.h. mit der Zellkultur wurde Agarnährmedium zur Kallusbildung angeimpft und nach ca. 1 Woche mit dem hellen, lockeren Kallusgewebe eine Zellsuspension initiiert (ca. 10 ccm Kallus auf 90 ml Medium). Die daraus resultierende Kultur wurde alle 5 - 6 Tage umgesetzt.

3.6. Protoplastenisolierung

a) Protoplastenisolierung aus Tabakblättern

1). Zwei-Schritt-Methode:

Die höchste Protoplastenausbeute wurde erzielt, wenn die Isolierung in Lösungen mit 0,5 M Mannit als Plasmolytikum durchgeführt wurden. Bei optimalen Voraussetzungen für die Ausgangspflanzen hinsichtlich Gewächshausklima und Jahreszeit konnten $3{,}1 \cdot 10^6$ intakte PP/g Blattgewebe isoliert werden gegenüber nur $1 \cdot 10^6$ PP/g Gewebe in Lösungen mit 0,7 M Mannit. Wurde

die Isolierung in Meyer'scher Salzlösung durchgeführt, betrug die Protoplastenausbeute nur $6,2 \cdot 10^5$ PP/g Gewebe. Der Anteil defekter Protoplasten an der Gesamtzahl Protoplasten lag im Juli in Mannitlösung bei 16 - 20%, in Meyer'scher Salzlösung bei 58%. Weitere Experimente wurden nur noch in 0,5 M Mannitlösungen durchgeführt.

Die Ausbeute war stark abhängig von der Jahreszeit. Im November sank die Ausbeute auf $1 - 1,7 \cdot 10^6$ PP/g Gewebe, im Dezember auf $6,9 \cdot 10^5 - 7,7 \cdot 10^5$ PP/g Gewebe. Im Januar und Februar stieg die Ausbeute wieder auf $9,2 - 9,9 \cdot 10^5$ PP/g Gewebe. Entsprechend betrug der Anteil defekter Protoplasten 40 - 60%. Auch Klimabedingungen, unter denen die Ausgangspflanzen angezogen wurden, waren von wesentlichem Einfluss auf die Ausbeute intakter Protoplasten. So konnten aus den im Gewächshaus bei 19 - 20°C und konstant hoher Luftfeuchtigkeit (ca. 70% RLF) angezogenen Pflanzen keine Protoplasten isoliert werden. Die Blätter dieser Pflanzen kollabierten sofort, nachdem sie mit Sterilisierlösungen in Kontakt kamen. Zur Protoplastenisolierung gut geeignete Pflanzen wurden bei ca. 25°C und ca. 40% RLF sowie 12.000 - 40.000 Lux Tageslicht angezogen.

2). Ein-Schritt-Methode:

Mit dieser Methode konnten in den Sommermonaten (April - Juli) $6,3 \cdot 10^6 - 1,2 \cdot 10^7$ intakte PP/g Blattgewebe isoliert werden. Der Anteil defekter Protoplasten an der Gesamtzahl Protoplasten betrug in diesem Zeitraum 5 - 15%. Somit ist hinsichtlich Protoplastenquantität und -qualität die Ein-Schritt-

Methode nach Beier und Bruening (1975) der Zwei-Schritt-Methode nach Takebe et al. (1968) überlegen, die Ausbeute intakter Protoplasten konnte um das 2 - 4fache gesteigert werden. Probleme durch Verunreinigung mit Korund traten nicht auf.

Auch in den Wintermonaten (November-Februar) konnte mit der Ein-Schritt-Methode der Anteil defekter Protoplasten bei 12 - 19% gehalten werden, die Ausbeute lag im diesem Zeitraum bei $1,5 - 2,2 \cdot 10^6$ PP/g Blattgewebe, d.i. um den Faktor 5 - 10 niedriger als im Sommer. Die Ausbeute glich damit dem Ertrag der Zwei-Schritt-Methode bei optimalen Bedingungen.

Wurden die Ausgangspflanzen bei ungünstigen Bedingungen angezogen, z.B. bei hoher Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus (s.o.) oder bei zu niedriger Lichtintensität in Klimaschränken (weniger als 10.000 Lux), konnten auch mit der Ein-Schritt-Methode keine für weitere Experimente verwendbaren Protoplasten isoliert werden. Der Anteil defekter Protoplasten stieg auf 45 - 89%.

b) Protoplastenisolierung aus einer Tabakzellsuspension

Aus einer in G-B_5-Medium mit nur 2,4-D als Auxin gewachsenen Zellsuspension konnten nur wenige Protoplasten isoliert werden (Quantität nicht exakt bestimmbar). Aus einer in G-B_5 mit 2,4-D und NAA aufgezogenen Kultur konnten jedoch Protoplasten nach der Methode von Negrutiu, Beetfink und Jakobs (1975) isoliert werden mit einer Ausbeute von $2 \cdot 10^5 - 5,5 \cdot 10^5$ PP/ml Zellsuspension, wobei viele quantitativ nicht erfassbare Zellbruchstücke auftraten. Wurde der Enzymlösung 1% KDS zugefügt, trat kein Zellbruchmaterial mehr auf und die Protoplastenausbeute stieg auf $4,7 - 7,2 \cdot 10^5$ PP/ml Zellsuspension. Eine Minderung der Mannitmolarität

von 0,7 M auf 0,5 M brachte keine höhere Protoplastenausbeute, da die Protoplasten beim Zentrifugieren auch bei erhöhter Drehzahl schlecht sedimentieren. Die Höhe der Ausbeute war gleichbleibend, unabhängig von der Jahreszeit.

Die Zählungen zur Feststellung der Lebensfähigkeit der Protoplasten im Nähragar ergaben nach 3 Wochen noch 31% intakte Protoplasten. Nach 7 Wochen waren keine der Protoplasten mehr intakt.

c) Protoplastenisolierung aus einer Sojazellsuspension

Mit der Methode nach Negrutiu, Beetfink und Jakobs (1975) wurden 4-5 Tage nach dem Umsetzen der Kultur Protoplasten mit einer Ausbeute von $4 \cdot 10^5 - 3 \cdot 10^6$ intakter PP/ml Zellsuspension isoliert. Die Isolierung von Sojaprotoplasten in 0,5 M Mannitlösung mit einem Zusatz von Cycloheximid beeinträchtigte die Ausbeute und Qualität der Protoplasten nicht. Es wurde teilweise sogar eine Protoplastenausbeute von $5,6 \cdot 10^6$ PP/ml Zellsuspension erreicht. Die Höhe der Ausbeute war gleichbleibend unabhängig von der Jahreszeit.

3.7. Infektionsversuche mit TMV-RNS und Protoplasten

a) Protoplasten aus Tabakblättern

In 11 Versuchen wurde im Ganzblatt-Biotest (2.3.1.1.) geprüft, ob eine TMV-Synthese in den Protoplasten stattgefunden hat. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt.

Deutliche Infektionserfolge konnten nur nach der Methode von Okuno und Furusawa (1978) mit unter Cyclo-

heximidzusatz isolierten Protoplasten erreicht werden (Tab. 1: Versuch 9). Wurden die Protoplasten mit dieser Methode in einem Kunststoffgefäss infiziert, konnte nach 38 h Inkubationszeit p.i. eine TMV-Vermehrung bis zu einem Faktor von 88,5 erzielt werden, wobei bereits zwischen 12 h und 21 h p.i. ein Anstieg um den Faktor 47,5 vorlag (Tab. 1: Versuch 7a). Der Hauptanstieg der TMV-Synthese lag folglich im Zeitraum bis 21 h p.i. wie auch die Ergebnisse von Versuch 9 (Tab. 1) zeigten. Hier stieg die TMV-Synthese zwischen 12 h und 21 h p.i. um den Faktor 26,1, von 12 h bis 38 h p.i. um den Faktor 42,7 an. Die TMV-Synthese verdoppelte sich somit zwischen 21 h und 38 h Inkubationszeit p.i. lediglich (Faktor 1,7 - 2,4; Tab. 1: Versuche 7a, 7b und 9).

In einem Experiment zum Vergleich der Verwendung von Kunststoff- bzw. Glasgefässen wurde mit Kunststoffgefässen ein etwas höheres Ergebnis erreicht (Tab. 1: Versuche 7a und 7b; 17,7 bzw. 16,3 Läsionen/Blatt), dieses Resultat wurde nicht weiter abgesichert. Die Infektionserfolge unterlagen starken Schwankungen durch Änderungen der Anzuchtbedingungen der Ausgangspflanzen für Protoplasten. Mussten die Pflanzen im Labor angezogen werden (Lichtintensität 2.400 - 5.000 Lux vergl. Gewächshaus: 15.000 - 40.000 Lux), sank der Infektionserfolg um 78% - 87% auf 3,6 Läsionen/Blatt (Tab. 1: Versuch 10). Aufgrund der kurzen Lebensdauer der Protoplasten in diesem Experiment war 38 h p.i. die TMV-Ausbeute noch weiter abgesunken. In den Versuchen 6 und 8 (Tab. 1) lag ebenfalls nur ein niedriger (2,4 Läsionen/Blatt) bzw. kein Infektionserfolg vor, hierbei können bei Versuch 8 jahreszeitliche Einflüsse (Januar) eine Rolle spielen.

Wurde die Methode von Okuno und Furusawa auf ohne Cycloheximidzusatz isolierte Protoplasten angewendet, konnte in einem Experiment eine TMV-Synthese nachgewiesen

Tab. 1: TMV-Synthese in Tabakblatt-Protoplasten nach Infektion mit TMV-RNS in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (h p.i.)

Versuch Nr.	Methode-Nr. [1]	Infektionserfolg (Ø Anzahl Läsionen/Blatt [2])			
		0 h	12 h	21 h	38 h
1	1 (Sarkar, Mannit)	0	0	0.2	0.5
2	1	0	0	0	0
3	2 (Sarkar, Salzlösung)	0	0	0	0
4	3a(Okuno u. Fur., ohne Cycl.)	0	0	4	4
5	3a	0	0	0	0
6	3b(Okuno u. Fur., mit Cycl.)	0	0.2	-	2.4
7a	3b -mit Kunststoff-	0	0.2	9.5	17.7
7b	3b -Glas-	0	0	6.8	16.3
8	3b	0	0	0	0
9	3b	0	0.7	18.3	29.9
10	3b	0	0	3.6	0.5
11	4 (Takebe)	0	0.5	1.5	4.3

[1] Versuchsnomenklatur nach Kap. 2.3.1.a

[2] Jeder Wert beruht auf den Läsionenzahlen von 15 Blättern (3 Pflanzen)

werden (Tab. 1: Versuchs 4), jedoch wurden nur 14 - 25% der TMV-Ausbeute der unter Cycloheximidzusatz isolierten Protoplasten erreicht.

Mit der in späteren Experimenten für DNS-Infektionen verwendeten Methode nach Suzuki und Takebe (1976) wurde auch mit TMV-RNS ein Infektionserfolg erreicht (Tab. 1: Versuch 11). Die TMV-Synthese stieg zwischen 12 und 38 h p.i. um den Faktor 8,6 an, wobei der Anstieg in 21 h Inkubationszeit p.i. (Faktor 3) deutlich niedriger war als in den Versuchen 7 und 9.

Mit der Infektionsmethode nach Sarkar konnten keine Protoplasten mit TMV-RNS infiziert werden (Versuche 1 - 3). Lediglich in Versuch 1 liegt ein sehr schwacher Infektionserfolg von 0.6 Läsionen/Blatt vor.

b) Protoplasten aus einer Sojazellsuspension

Zur Infektion von Sojaprotoplasten mit TMV-RNS wurden 4 Experimente nach der Methode von Okuno und Furusawa (1978) durchgeführt, die alle negativ verliefen. Die Versuchsbedingungen entsprachen den Infektionsversuchen 6 - 10 (Tab. 1) mit Protoplasten aus Tabakblättern.

3.7.1. Nachweis von TMV in Tabakprotoplasten durch Immunfluoreszenz

Aus 2 Infektionsversuchen mit TMV-RNS wurden fixierte Protoplasten zum Nachweis von TMV-Protein durch Immunfluoreszenz verwendet. Die Protoplasten waren unter Zusatz von Cycloheximid isoliert und nach der Methode von Okuno und Furusawa (1978) infiziert worden.

Grüne Fluoreszenz wurde als Kriterium für durch TMV-Protein hervorgerufene Fluoreszenz angenommen (Mertes, 1979). Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 2 dargestellt.

Der Protoplastenanteil mit spezifischer TMV-Fluoreszenz lag 21 h und 38 h p.i. bei 32,4% bzw. 36,08 (Versuch 1)

Tab. 2: Nachweis von TMV-Protein in TMV-RNS-infizierten Tabakprotoplasten durch Immunfluoreszenz in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (h p.i.)

Versuch-Nr.	Probenahme (h p.i.)	Gesamtzahl der PP [1]	PP-Zahl mit spezifischer Fluoreszenz	Relativer PP-Anteil mit spezifischer Fluoreszenz (%)
1	0	225	2	0,88
	21	111	36	32,4
	38	97	35	36,08
	K[2]	1 206	8	0,66
2	0	124	0	0
	21	117	29	24,79
	K	833	9	1,08

1) Zählung vergl. 2.3.1.2.

2) Kontrolle: Färbung nichtinfizierter Protoplasten

und 24,8% (Versuch 2). Dies bedeutet, dass 1/4 bis 1/3 der TMV-RNS behandelten Protoplasten tatsächlich infiziert worden waren, so dass eine Virusreplikation, resultierend in infektiösen TMV-Partikeln (s. 3.7.) stattfinden konnte. Der Unterschied zwischen den 21 h- und 38 h-Proben in Versuch 1 ist statistisch nicht signifikant (Vierfelder-X^2-Test, Weber 1972: Prüfgrösse V = 0,31, Signifikanzschwelle $V^*_{FG=1,\alpha=5\%} = 3,84$). Eine Zunahme infizierter Protoplasten während der Inkubation ist auch nicht zu erwarten da in einem Infektionssystem aus Einzelzellen, wie es die Protoplasten darstellen, keine Virusausbreitung von Zelle zu Zelle möglich ist. In den nichtinfizierten Kontrollen sowie in den 0 h-Proben zeigten 0 - 1,08% der Protoplasten spezifische Fluoreszenz.

3.8. Infektionsversuche mit fd-Phage und Protoplasten

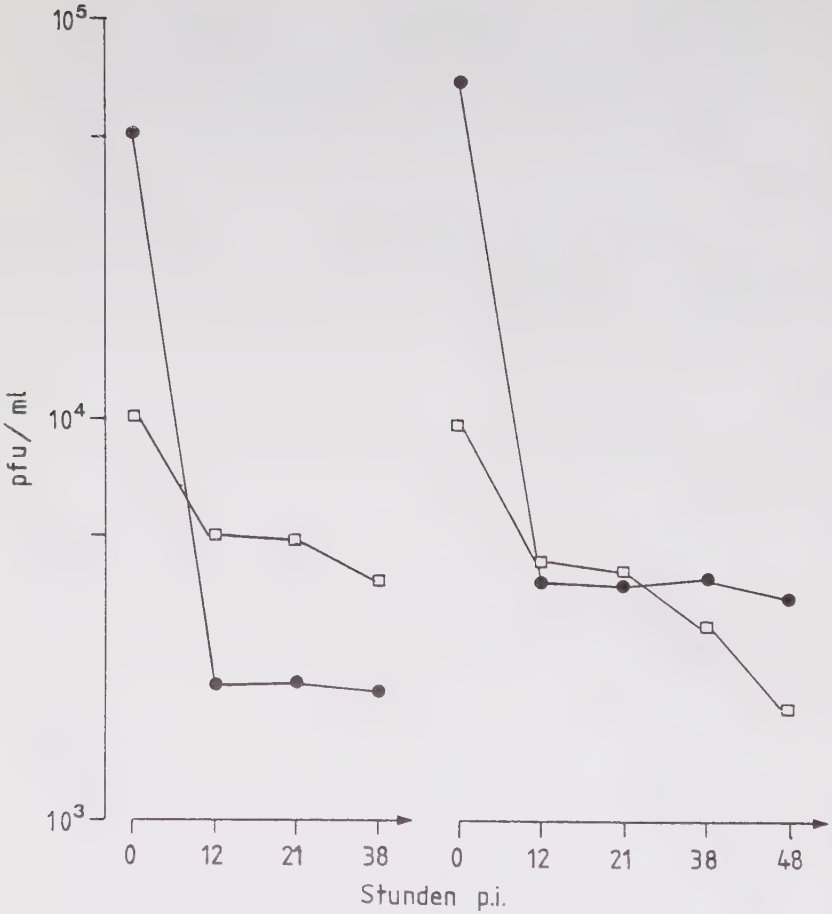
a) Infektionsversuche mit Protoplasten aus Tabakblättern

Eine Zunahme der fd-Partikeln nach Inkubation mit Tabakprotoplasten wurde nicht beobachtet. Der Gehalt an fd-Partikeln nahm innerhalb 12 h p.i. in den Protoplasten um 80% ab, blieb dann allerdings bis 38 h p.i. fast konstant (Abb. 2a). Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 h p.i. führte zu keiner signifikanten Absenkung bzw. Anstieg der Menge an fd-Phagen in der Protoplastenprobe. Lediglich im Überstand der Protoplastensedimentation sank der Phagengehalt weiter ab (Abb. 2b). Da aufgrund des hohen Backgrounds infektiöser Phagenpartikeln aus dem Infektionsschritt nicht entschieden werden kann, ob 12 - 48 h p.i. nicht abgebautet Phagenpartikeln aus dem Infektionsschritt erfasst werden, oder ob eine konstante Phagensynthese vorliegt, wurden weitere Experimente mit fd-Phagen-DNS durchgeführt.

b) Infektionsversuche mit Protoplasten aus einer Sojazellsuspension

Im ersten Infektionsversuch von Sojaprotoplasten mit fd-Phagenpartikeln war 12 h p.i. eine Zunahme an Phagenpartikeln im Überstand der sedimentierten Protoplasten zu verzeichnen. In der Protoplastenfraktion nahm der Gehalt an fd-Phagen in 12 h p.i. um 90% ab, bis 38 h p.i. waren sowohl in den Protoplasten als auch im Überstand keine fd-Partikeln mehr infektiös (Abb. 3a). Da der 12-h-Peak im Überstand auch durch die Ablösung von lediglich an der Protoplastenoberfläche haftenden Phagen erklärbar wäre, wurde versucht, den Waschvorgang der Protoplasten nach der Infektion zu verbessern, indem eine alkalische Waschlösung (pH 9,6) verwendet wurde. Es wurde erwartet, dass der Phage aufgrund seines isoelektrischen Punktes von 9,0 bei einem pH von 9,6 negativ geladen ist und besser von den negativ geladenen Protoplasten entfernbar ist. In dem hierzu durchgeführten Experiment wie auch in zwei weiteren Experimenten war sowohl bei Standardwaschlösungen als auch bei alkalischer Waschlösung kein Peak mehr vorhanden. Der Background von Phagenpartikeln aus dem Infektionsschritt ging jedoch bei alkalischer Waschlösung in der 0-h-Probe zurück (Abb. 3b). Der Verlust der Infektiosität der verbleibenden Phagenpartikeln war bis 38 h p.i. in dem Ansatz mit Standardwaschlösung und hohem 0-h-Phagentiter schneller. Er sank hier innerhalb 12 h um fast 100%, dagegen im Ansatz mit alkalischer Waschlösung und relativ niedrigerem 0-h-Phagentiter nur um ca. 58%. Vermutlich mobilisiert eine hohe Phagenkonzentration schnell grosse Mengen abbauender Enzyme in den Protoplasten. Da in allen Experimenten die fd-Phagen in Sojazellumgebung schnell und vollständig ihre Infektiosität verloren, wurden keine weiteren Experimente mit fd-Phagen oder fd-DNS an Sojaprotoplasten durchgeführt.

Abb. 2 fd-Phagengehalt (pfu/ml) [1] phageninfizierter Protoplasten aus Tabakblättern sowie ihres Kulturmediums in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (h p.i.)



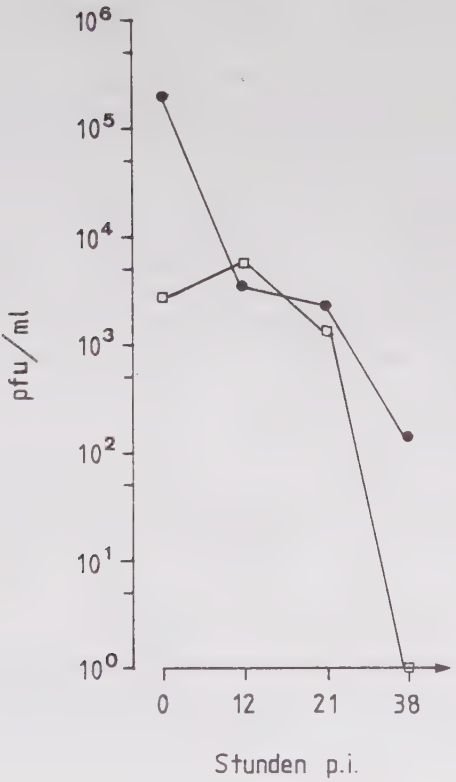
1) jeder Punkt beruht auf dem Mittelwert der pfu/ml auf 3 Platten. Je Zeitwert wurden 0,1 ml der Probe plattiert, von der 0 h-Probe wurden zusätzlich 0,1 ml einer 1:100 Verdünnung plattiert. Die Ordinate ist logarithmisch eingeteilt.

●—● Protoplasten

□—□ Kulturmedium

Abb. 3a, 3b fd-Phagengehalt (pfu/ml) [1] phageninfizierter Protoplasten aus einer Sojazellsuspension sowie ihres Kulturmediums in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (h p.i.)

a)

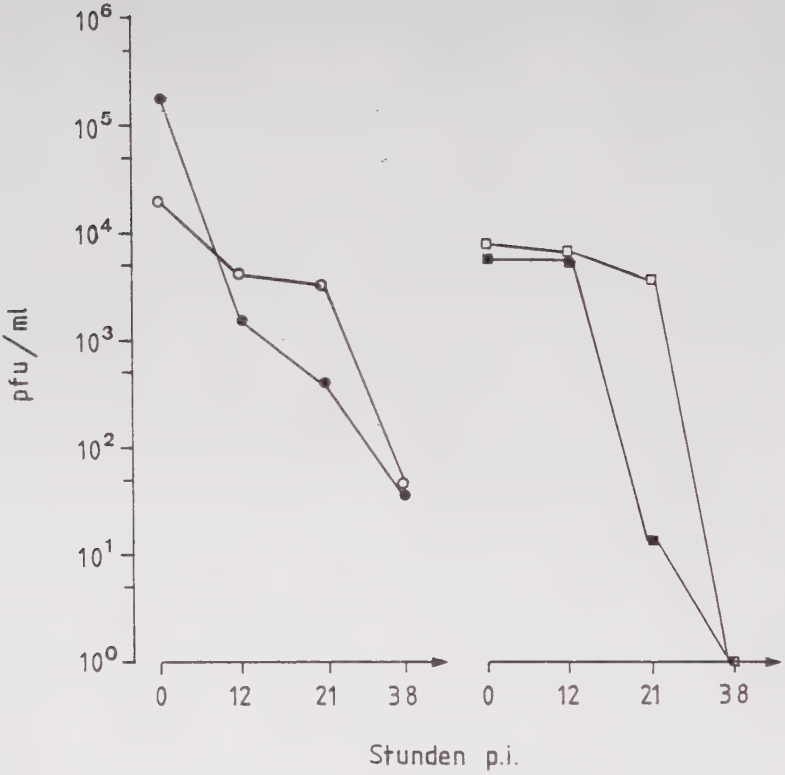


1) jeder Punkt beruht auf dem Mittelwert der pfu/ml auf 3 Platten. Je Zeitwert wurden 0,1 ml der Probe plattiert, von der 0 h-Probe wurden zusätzlich 0,1 ml einer 1:100 Verdünnung plattiert. Die Ordinate ist logarithmisch eingeteilt.

●—● Protoplasten

□—□ Kulturmedium

b)



1) jeder Punkt beruht auf dem Mittelwert der pfu/ml auf 3 Platten. Je Zeitwert wurden 0,1 ml der Probe plattiert, von der 0 h-Probe wurden zusätzlich 0,1 ml einer 1:100 Verdünnung plattiert.
Die Ordinate ist logarithmisch eingeteilt.

●—● Protoplasten, mit Standardwaschlösung behandelt

○—○ Protoplasten, mit Waschlösung-pH 9,6 behandelt

■- ■ Kulturmedium der mit Standardwaschlösung behandelten Protoplasten

□—□ Kulturmedium der mit Waschlösung-pH 9,6 behandelten Protoplasten

3.9. Infektion von Protoplasten aus Tabakblättern mit fd-DNS

3.9.1. Nachweis infektiöser Phagenpartikeln in Tabakprotoplasten

Es wurden 5 Experimente zur Infektion von Tabakprotoplasten mit fd-DNS durchgeführt und im Plaquetest (2.3.3.1.) ausgewertet. Alle Experimente verliefen negativ. Sowohl in den im Plaquetest getesteten Proben infizierter Protoplasten sowie in den im Tropftest unverdünnt getesteten infizierten Protoplasten konnte keine Plaquebildung nachgewiesen werden. Die zur Kontrolle des Infektionssystems in jedem Experiment durchgeführten Tropftests sowie Verdünnungsreihe mit fd-Phagen verliefen alle positiv.

3.9.2. Test auf fd-Protein in Tabakprotoplasten durch Immunfluoreszenz

Es konnte keine fd-spezifische Fluoreszenz in fd-DNS-behandelten Tabakprotoplasten nachgewiesen werden.
In allen fixierten Proben fd-DNS infizierter Protoplasten konnten nur Protoplasten mit unspezifischer, d.i. gelblicher oder rötlicher Fluoreszenz beobachtet werden.

3.9.3. Lokalisierung von fd-DNS in Tabakprotoplasten durch Autoradiographie

Die im Anschluss an Infektion und Waschvorgang mit den Protoplasten assoziierte Aktivität betrug $3,46 \cdot 10^5$ dpm, d.i. 11,5% der eingesetzten Aktivität (Aktivität der Waschlösung: $2,6 \cdot 10^6$ dpm).

Eine Interpretation der autoradiographischen Analyse wurde durch den hohen Hintergrund an Silberkörnern in der Filmschicht erschwert. Eine Anreicherung der ^{3}H-DNA in definierten intrazellulären Bereichen kann jedenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 4). Um die mit dem infizierten Protoplasten assoziierte Anzahl Silberkörner gegen den Hintergrund abzugrenzen, wurde das Experiment statistisch ausgewertet. Hierzu wurde die Abbildung mit Punkten im Abstand von 2,5 mm gerastert und sowohl für die Umgebung des Protoplasten sowie für den Protoplasten selbst die Anzahl Silberkörner gezählt, welche mit einem Punkt des Rasters zur Dekkung kamen. Das Zellinnere des Protoplasten und ein 5 mm breiter Zellmembranbereich wurden hierbei getrennt ausgewertet. Dieses Verfahren dient der Schätzung der Flächenanteile der Silberkörner an der Gesamtfläche. Das Raster bestand aus 3 082 Punkten von denen 1 463 auf der Protoplastenumgebung und 1 619 auf dem Protoplasten lagen. Hiervon überlappten 18 bzw. 36 Punkte mit einem Silberkorn. In der Zellmembranzone überlappten 25 von 429 Punkten mit einem Korn. Die Daten wurden in einem Signifikanztest (Vierfelder-X^2-Test; Weber, 1972) untereinander verglichen. Der Test ergab bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (Signifikanzschwelle $V^{*}_{FG=1} = 3,84$) einen hochsignifikanten Unterschied zwischen Zellmembranbereich und Zellinnerem (Prüfgrösse V = 34,87) und zwischen Zellmembranbereich und Protoplastenumgebung (Prüfgrösse V = 31,56). Keine Signifikanz ergab sich zwischen Zellinnerem und Umgebung (Prüfgrösse $V = 2,14 \cdot 10^{-4}$). Ein Vergleich des gesamten Protoplasten mit der Umgebung ergab eine schwache Signifikanz (Prüfgrösse V = 4,4).

Bei Auswertung einer weiteren Abbildung nach dem gleichen Verfahren wurden diese Aussagen bestätigt. Auch hier ergab sich Signifikanz bei den Vergleichen Zellmembranbereich/

Zellinneres (Prüfgrösse V = 10, 18), Zellmembranbereich/Umgebung (Prüfgrösse V = 15,9) und Protoplastenumgebung/gesamter Protoplast (Prüfgrösse V = 4,76). Keine Signifikanz ergab der Vergleich Zellinneres/Umgebung (Prüfgrösse V = 0,45).

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass nur im Bereich der Zellmembran, nicht im Innern der Protoplasten, Radioaktivität nachgewiesen werden kann.

Die im Szintillationszähler gemessene, mit den Protoplasten assoziierte Aktivität lässt auf einem Protoplastenquerschnitt durchschnittlich ca. 30 spezifische Körner erwarten (Protoplasten-Durchmesser: 30 µm, Schnittdicke: 50 nm, Expositionszeit: 36 Tage, Filmefficiency: 25%). Vorhanden sind maximal ca. 28 spezifische Silberkörner pro Protoplast im Zellmembranbereich. (Diese Schätzung wurde erreicht, indem Abbildung 4 mit einem Raster von 0,9 mm^2-Quadraten bedeckt wurde und die Anzahl Quadrate mit 0, 1, ..., 6 Körnern bestimmt wurde. Hierbei ergab sich, dass auf dem Protoplasten und der Umgebung Quadrate mit 0 bzw. 1 Korn gleich häufig auftraten, dass aber 37 Silberkörner im Zellmembranbereich des Protoplasten in Quadraten mit mehr als einem Korn auftraten im Vergleich zu nur 9 Silberkörnern in der Umgebung. Die Anzahl signifikant gehäuft auftretender Körner wurde als Schätzwert für die Anzahl spezifischer Körner gewählt). Daraus folgt, dass 2-3 h p.i. (Zeitwert der Fixierung) ein grosser Teil der ^{3}H-fd-DNS noch nachweisbar war.

Da intrazellulär keine ^{3}H-fd-DNS nachzuweisen war, ist zu vermuten, dass die Phagen-DNS in den Protoplasten sofort abgebaut wird. Ein rascher Abbau (1-4 h p.i.) heterologer Bakterien-DNS und Phagen-DNS in pflanzlichen Protoplasten wird von zahlreichen Autoren berichtet

(Suzuki u. Takebe, 1976; Hughes et al., 1977; Heyn u. Schilperpoort, 1973). Läsionen in der Protoplastenmembran infolge der Anwendung von PLO bei der Infektion (Abb. 4↑; Burgess et al., 1973) erleichtern ein Auswaschen von DNA-Abbauprodukten an den Infektionsstellen.

3.9.3.1. Elektronenmikroskopie nichtinfizierter Tabakprotoplasten aus Blättern

Für eine Virusinfektion der Protoplasten ist ein vollständiger Abbau der Zellwand wichtig. Die ca. 3 h nach der Isolierung fixierten Protoplasten zeigten keinerlei Zellwandreste (Abb. 5 u. 7). Die Protoplastenmembran war intakt und frei von Läsionen, wie sie nach Infektion der Protoplasten in Anwesenheit von PLO zu beobachten waren. Die Feinstruktur der Zellorganellen war durch die Isolierung nicht verändert oder geschädigt (Abb. 6), lediglich im Stroma der Chloroplasten waren häufig auffallende kristalline Einschlusskörper vorhanden (Abb. 7). Ähnliche Einschlusskörper werden auch bei plasmolysierten Zellen in Blattgewebe beschrieben (Taylor u. Hall, 1978). Ihre Entstehung beruht auf dem hypertonischen Medium (0,5 M Mannit) welches für die osmotische Stabilisierung der Protoplasten notwendig ist. Takebe (1973) charakterisiert diese Strukturen als Fraction-1-Protein, d.i. vorwiegend Ribolosebiphosphat-carboxylase.

Abb. 4 Lokalisierung von ^{3}H-fd-DNS in Protoplasten aus Tabakblättern

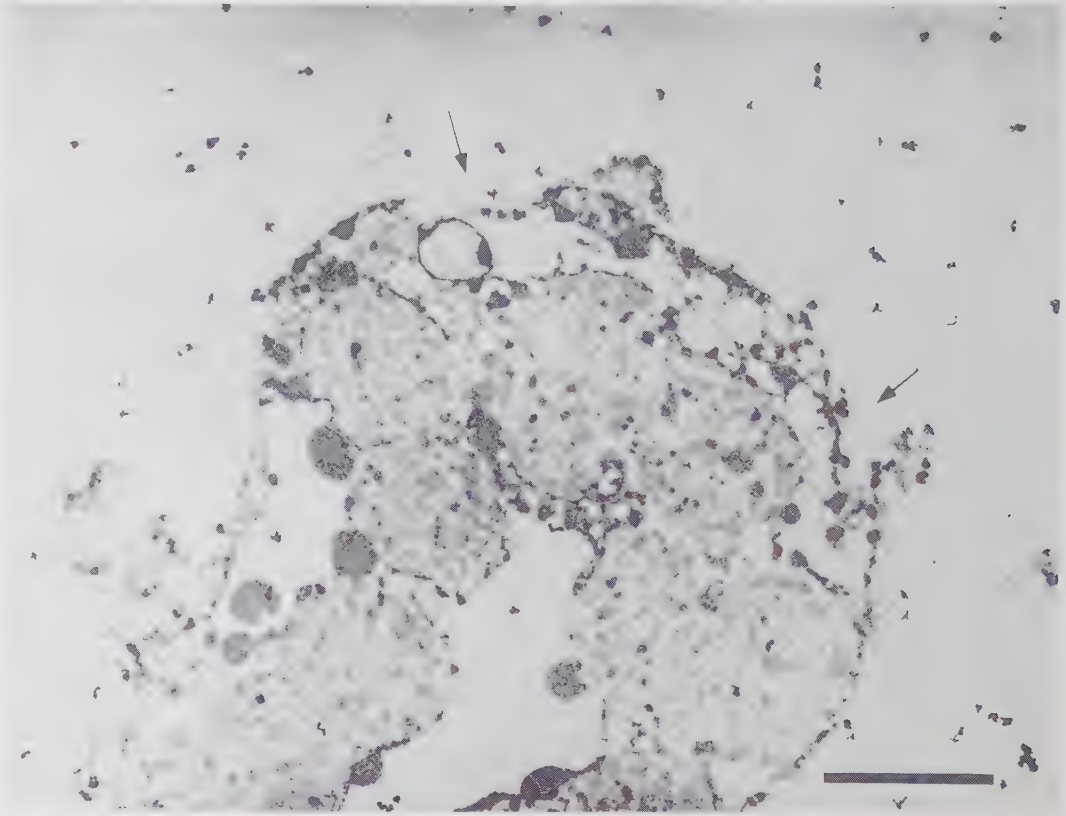
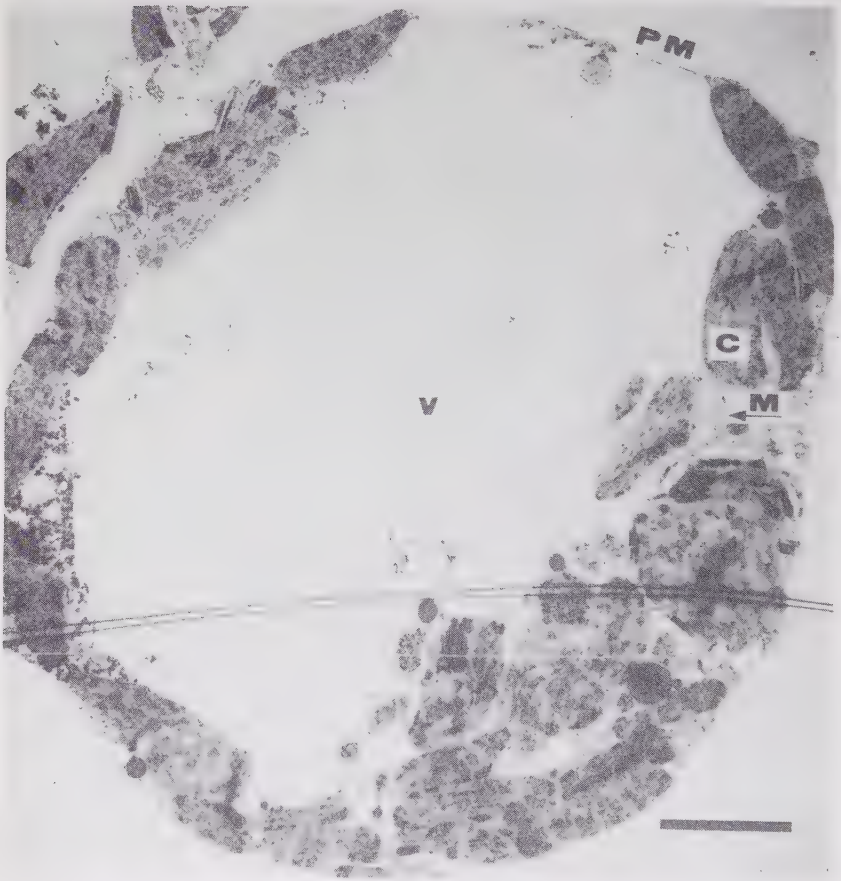
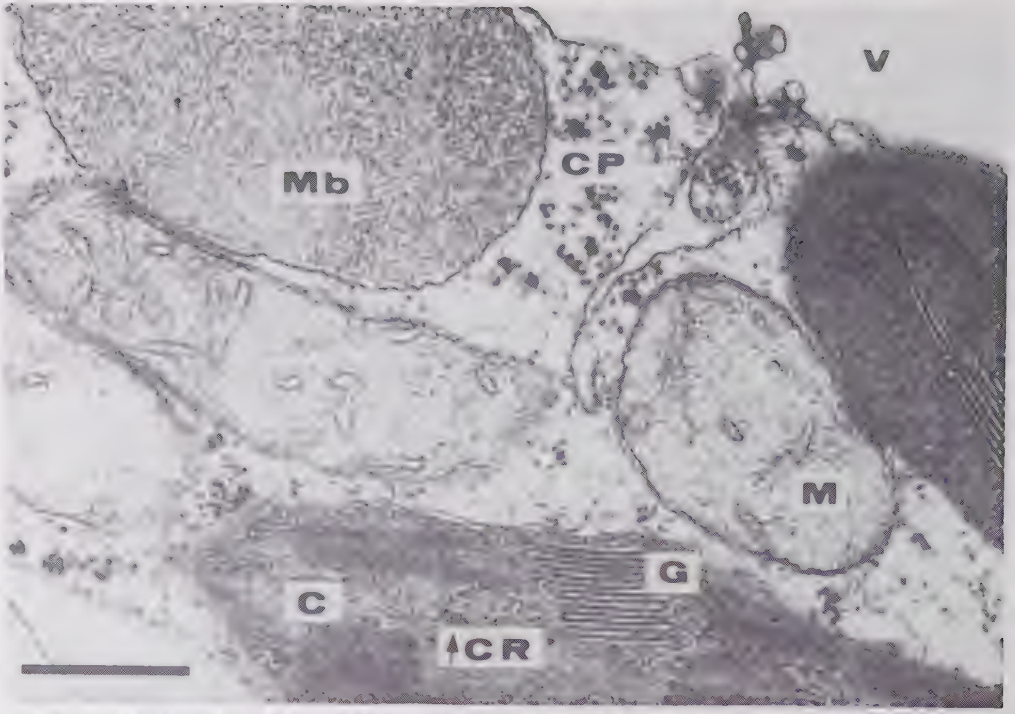


Abb. 5 Übersicht über einen nichtinfizierten Protoplasten aus Tabakblättern



Protoplastenmembran; die Zellwand fehlt vollständig (PM), Vakuole (V), Chloroplast (C), Mitochondrium (M). x 3400 (Balkenlänge = 5 µm).

Abb. 1 Zellorganellen eines nichtinfizierten Protoplasten aus Tabakblättern



Chloroplast (C), Chloroplastenribosomen (CR), Granum (G), Mitochondrium (M), Microbody (Mb), Cytoplasma mit Ribosomen (CP), Vakuole (V). x 44 000 (Balkenlänge = 0,5 µm).

Abb. 7 Chloroplast eines nichtinfizierten Protoplasten aus Tabakblättern mit parakristallinen Einschlusskörpern

a) Protoplastenmembran (PM), Chloroplastenmembran (CM), Granum (G), Stromathylakoid (S), Pyrenoid (P), parakristalline Einschlusskörper (E), Cytoplasma (CP), Vakuole (V). x 44 000 (Balkenlänge = 0,5 µm).

b) parakristalliner Einschlusskörper, x 73 000

3.10. TMV-Synthese in Zellen einer Tabakzellsuspensionskultur

Zellen einer Suspensionskultur von *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. konnten mit TMV infiziert werden. Die Infektiosität war in allen Versuchen (Tab. 3) am 3. Tag p.i. höher als in der 0-h-Probe (Faktor 1,5 - 3,49). Ein zweiter TMV-Vermehrungszyklus war nach 1:10-Verdünnung der Kultur mit frischem Medium vorhanden: die Infektiosität stieg bis zum 3. Tag nach dem Kulturtransfer (d.i. 8 Tage p.i.) um den Faktor 20-28 (Tab. 3, Versuche 1-3).

Ein Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Suspensionszellen (4-5 Tage nach Verdünnung) war immer mit einer Infektiositätsabnahme verbunden. Die Infektiosität nahm zwischen 3 Tagen p.i. und 5 Tagen p.i. sowie zwischen 8 Tagen p.i. und 10 Tagen p.i. jeweils um 55% - 72% ab (Tab. 3, Versuche 1-3). Zum Vergleich: wurden $1 \cdot 10^{-6}$ g TMV/ml 3 Tage im Kulturüberstand einer zentrifugierten, 5 Tage alten Tabakzellsuspension bei 28°C inkubiert, ging die Infektiosität des Virus um 97,4% zurück.

Die TMV-Vermehrung in der Kultur war immer mit einem Absterben von Zellen verbunden. Bereits 3 Tage p.i. waren im Lichtmikroskop in allen Zellverbänden neben typisch aussehenden, plasmaströmung zeigenden Zellen auch abnormale Zellen mit extremer Vakuolisierung und fehlender Plasmaströmung zu beobachten. Einzelzellen dieses Typs traten nicht auf, der Anteil in den Zellverbänden lag bei ca. 20%. Hatte die Kultur nach der Verdünnung einen zweiten TMV-Vermehrungszyklus durchlaufen, waren alle Zellen in der Kultur abgestorben (10 Tage p.i.) und eine Weiterkultivierung war nicht mehr möglich. In einem Experiment wurde die Zellkultur bereits nach Erreichen der Infektiositätsmaxima 3 Tage p.i. und 6 Tage p.i. mit frischem Medium verdünnt (Tab. 3, Versuch 4).

Tab. 3: TMV-Synthese in Tabakzellen in Suspensionskultur in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Tage p.i.)

Versuch-Nr.	Infektionserfolg (%) [1]					Vermehrungsfaktor I [4]	Vermehrungsfaktor II [5]
	Inkubationszeit (Tage p.i.) [2]						
	0	3	5	8	10		
1	97	161	41	103	-	1,7	25,1
2	603	1273	416	1164	527	2,1	28
3	546	819	327	656	217	1,5	20,1
	Inkubationszeit (Tage p.i.) [3]						
	0	3	6	9			
4	82	285	166	0,25		3,49	

1) Als Mass für den Infektionserfolg einer Probe wurde die Summe der Läsionenzahlen auf 15 Probenblatthälften als Prozent der Summe der Läsionenzahlen auf 15 gegenüberliegenden Standardblatthälften (Standard = 10^{-6} g TMV/ml) berechnet (Biotest auf *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi).
2) Die Zellsuspension wurde nach der Probenahme am 5. Tag p.i. 1:10 mit Nährmedium verdünnt und weiterkultiviert.
3) Die Zellsuspension wurde jeweils nach der Probenahme am 4. und 6. Tag p.i. 1:10 mit Nährmedium verdünnt und weiterkultiviert.
4) Anstieg der TMV-Infektiosität 3 Tage p.i. über die Infektiosität 0 h p.i.
5) Anstieg der TMV-Infektiosität 8 Tage p.i. über die 1:10 verdünnte Infektiosität 5 Tage p.i.

Dies brachte weder eine höhere TMV-Ausbeute im zweiten Vermehrungszyklus, noch wurde das Absterben der Kultur dadurch verzögert. Zwischen 6 Tagen p.i. und 9 Tagen p.i. vermehrten sich in der Kultur keine Zellen mehr und die TMV-Infektiosität wurde nahezu vollständig abgebaut.

Auffallend war das oben beschriebene auf Zellverbände beschränkte Auftreten atypischer Zellen. Da die Zellkultur aus Protoplasten von *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. erstellt wurde, sind die Zellen der Kultur Träger des "NN"-Gens, welches bei TMV-infizierten Pflanzen eine hypersensitive Reaktion steuert, wobei einer TMV-Infektion eine nekrotische Läsion folgt. Bei Protoplasten und Einzelzellen unterbleibt diese Reaktion. Möglicherweise reicht der Zellkontakt in den kleinen Zellverbänden der Suspensionskultur für eine hypersensible Reaktion TMV-infizierter Zellen aus, was schliesslich ein Absterben der Kultur zur Folge haben muss. Zellen in den Kontrollen starben nicht ab.

3.11. Konservierung pflanzlicher Zellsuspensionskulturen durch Einfrieren

Eine Rekultivierung der mit verschiedenen Methoden (2.4.) eingefrorenen Sojazellen war in keinem Versuchsansatz möglich. Die Rekultivierung scheiterte nicht an einer Toxidität der Kälteschutzmittel. Wurden Zellen ohne anschliessendes Einfrieren vor Kultivierung auf Agar mit Kälteschutzmitteln inkubiert, so hemmte keines dieser Mittel die Vermehrung der Zellen und die Bildung von Kallusgewebe. Die Schädigung der Sojazellen erfolgte beim Prozess des Einfrierens bzw. Auftauens, wobei eine übermässige Konzentration gelöster Stoffe in einzelnen Zellkompartimenten sowie die Bildung von Eiskristallen in Cytoplasma und Vakuole die beiden schädigenden Hauptfaktoren darstellen (Withers, 1980).

IV. DISKUSSION

Tabak ist eine für virologische Studien geeignete und bewährte Pflanze. Tabakblätter sind gut geeignet zur Isolierung von Protoplasten, welche ein Infektionssystem synchron infizierbarer Einzelzellen darstellen. Die Reaktionsfähigkeit der Tabakpflanzen auf Virusinfektionen sowie die Ausbeute und Funktionstüchtigkeit von Protoplasten aus Blättern werden jedoch sehr stark von der Jahreszeit und klimatischen Schwankungen bei der Anzucht der Pflanzen beeinflusst. Zudem erfordert die Pflanzenanzucht einen grossen Gewächshausaufwand. Es wurde in dieser Arbeit angestrebt, mit Tabakzellen in Suspensionskultur als kontinuierliche Quelle für kleine Zellaggregate und Einzelzellen oder Protoplasten diese Schwierigkeiten zu umgehen.

Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge konnte eine Suspensionskultur einer Zellinie von *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. erstellt und mit TMV infiziert werden. Aus den Einzelzellen und Zellaggregaten der Kultur können Protoplasten isoliert werden. Soweit bekannt, existiert keine weitere kontinuierliche Zellsuspensionskultur dieser Tabakvarietät.

Als ein dem Zellstoffwechsel von Tabakzellen optimal entsprechendes Nährmedium hatte sich das Gamborg-B_5-Medium (Gamborg, 1968; Mertes, 1979) erwiesen. In dieser Arbeit war zu untersuchen, welcher Einfluss vom Hormontyp auf die Zellmorphologie und die Dissoziationsfähigkeit der Kultur ausgeht. Art und Konzentration der verwendeten Wuchsstoffe müssen so an die Zellen angepasst sein, dass sie in der Suspension eine sphärische Form behalten und sphärische Aggregate bilden. Eine Polarisierung des Zellwachstums sowie die Ausbildung von Zellketten, Verzweigungen und Differenzierungserscheinungen muss unterbleiben.

Für die vorliegende Tabakzellinie erwies sich eine Hormonkombination von 1 mg/ml 2,4-D mit 1 mg/ml NAA als besonders geeignet. Nach 31 Tagen Kulturdauer lagen 92 - 94% der Suspensionszellen als kugelige Zellen einzeln sowie in sphärischen Zellaggregaten bis ca. 90 Zellen vor. Beschränkungen der Hormonzugabe auf NAA resultierte in einer Polarisierung des Zellwachstums und schlechter Dissoziation der Zellen, so dass stark verzweigte Zellketten langgestreckter Zellen in der Kultur dominierten. Kinetinzugabe löste Differenzierung aus.

Die Reaktion einer Zellinie auf Wuchsstoffe muss für jede Zellinie individuell bestimmt werden. Für Zellinien von anderen Cultivaren der Species *Nicotiana tabacum* publizierte Wuchsstoffbedürfnisse (u.a. Ushimiya u. Murashige, 1974; Motoyoshi u. Oshima, 1968; Heyn u. Schilperoort, 1973) umfassen alle möglichen Hormonkombinationen sowohl die Wahl der Auxine wie die Zugabe von Kinetin betreffend. Auch über eine in wuchsstofffreiem Medium wachsende, sphärische Zellformen und -aggregate liefernde Zellinie wird berichtet (Opatrny u. Opatrna, 1976). Für *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi jedoch lagen keine derartigen Informationen vor. Bei der Erstellung einer neuen Zellinie muss die dieser Zellinie eigene Interaktion zwischen Wuchsstoffen im Medium und endogenen Wuchsstoffen in jedem Fall untersucht werden wie die Versuche mit cv. Xanthi zeigten.

Die Dissoziationsfähigkeit einer Zellsuspension ist auch abhängig von der Konsistenz des zum Animpfen verwendeten Kallusgewebes. Zum Animpfen einer gut dissoziierenden Suspensionskultur sollte lockeres Kallusgewebe verwendet werden. Nach Negrutiu (1975) besteht eine Korrelation zwischen der Härte eines Kallusgewebes und dem Kinetingehalt des verwendeten Mediums, unabhängig von der Art der verwendeten Auxine. Da in dieser Arbeit Kallusgewebe aus Keimlingen oder Protoplasten kultiviert wurde, konnte auf den Zusatz von Kinetin im Nährmedium nicht verzichtet werden, und es stand zunächst nur hartes

Kallusgewebe zur Verfügung. Durch eine Passage auf kinetinfreiem Medium konnte die Konsistenz des Kallusgewebes stark verfeinert werden, so dass es zum Animpfen einer Suspensionskultur geeignet war. Die Dissoziationsfähigkeit der Suspensionskultur konnte durch Passagen über Agarmedium weiter verbessert werden. Auch Wilson und Street (1975) beschrieben die Selektion einer in kleine Zellaggregate dissoziierenden Kultur von *Hevea brasiliensis* durch Passagen über Agar.

Wesentlich für die Zellvermehrung und die Dissoziationsfähigkeit einer Suspensionskultur sind auch die Volumenverhältnisse bei der Verdünnung mit frischem Medium. Die in dieser Arbeit etablierte Zellinie wurde ca. 1:10 verdünnt. Eine stärkere Verdünnung der Kultur führte zu verstärkter Zellaggregation, bei schwächerer Verdünnung wurde das Wachstum der Kultur beeinträchtigt, vermutlich infolge des hohen Anteils alten Nährmediums.

Die Infektion der Tabakzellsuspensionskultur mit TMV durch Behandlung des Zell-Virusgemisches mit einem Vortex-Gerät ermöglicht *in-vitro*-Infektionsversuche mit minimalem Arbeits- und Zeitaufwand. Der Nachteil im Vergleich zu einem Einzelzell-Infektionssystem mit Protoplasten liegt in der fehlenden Synchronisation des Infektionsablaufs, da eine Ausbreitung des Virus innerhalb der Zellen eines Zellaggregates möglich ist. Untersuchungen über den Ablauf der Virusreplikation auf zellulärer Ebene und Puls-Chase-Experimente sind daher nicht möglich. Soll jedoch nur die Gesamtinfektiosität eines Infektionssystems quantitativ erfasst werden, z.B. bei der Erprobung potentieller antiviraler Substanzen, so kann auf die Protoplastenpräparation verzichtet werden. Eine Zellsuspensionskultur aus Einzelzellen und kleineren Zellaggregaten stellt ein konstant

zur Verfügung stehendes *in-vitro*-Infektionssystem dar, welches reproduzierbare Versuchsbedingungen gewährleistet, im Gegensatz zur ganzjährigen Anzucht von Testpflanzen. Im Gegensatz zu den empfindlichen, zellwandlosen Protoplasten kann die Zellkultur jedoch robust gehandhabt werden.

Die Infektion der Zellen durch Verwendung eines Vortex-Gerätes erfolgt vermutlich durch kleine Wunden in der Zellwand, durch die TMV in die Zelle eindringen kann (Murakishi et al., 1971).

Da die TMV-Vermehrung in der Suspensionskultur in zwei Zyklen ablief mit einem ersten Maximum 3 Tage p.i. und einem zweiten Maximum 8 Tage p.i. kann ein synchroner Infektionsablauf im zweiten Zyklus verursacht durch Kulturverdünnung mit frischem Medium, diskutiert werden. Andere Autoren berichten in der Mehrzahl über in einem Zyklus stattfindende Virusvermehrung in infizierten Zellsuspensionskulturen mit einem Maximum 5 - 8 Tage p.i. (Murakishi et al., 1971; Motoyoshi u. Oshima, 1968; Wu et al., 1978). Beachy und Murakishi (1973) fanden hingegen in TMV-Infektionsversuchen mit Kallusgewebe von hypersensitivem Tabak ebenfalls zwei Infektionsmaxima ca. 72 h und ca. 100 h p.i.. Etwa 44 h p.i. beobachteten sie die Bildung von Läsionen auf der Kalluskultur. Möglicherweise gehen diese auf die primär infizierten Zellen zurück, in welchen der erste TMV-Vermehrungszyklus stattfindet. Über Plasmodesmen weiterverbreitetes TMV könnte dann zu einem späteren Zeitpunkt einen zweiten Vermehrungszyklus in der Kultur durchlaufen. Da in der TMV-infizierten Tabakzellinie dieser Arbeit ebenfalls in jedem Experiment 3 Tage p.i. ca. 20% abnormale bzw. abgestorbene Zellen in den Zellaggregaten auftraten, welche möglicherweise eine Expression des "NN"-Gens dieser Zellen darstellen, könnte dieses Absterben infizierter Zellen eine mehrzyklische TMV-Synthese

zur Folge haben. Voraussetzung hierzu wäre, dass die TMV-Synthese in den primär infizierten Zellen durch die hypersensitive Reaktion gehemmt würde. Dies hätte einen vorübergehenden Abfall der Virusreplikation zur Folge bis in über Plasmodesmen sekundär infizierten Zellen eine weitere Virusvermehrung abläuft. Mehrere TMV-Vermehrungszyklen müssten dann zum Absterben der Kultur führen. In dieser Arbeit war die infizierte Zellsuspension in jedem Experiment nach dem zweiten Vermehrungzyklus abgestorben. Nach Beachy und Murakishi (1973) hat die hypersensitive Reaktion jedoch keinen hemmenden Effekt auf die TMV-Synthese in Kallusgewebe.

Die hypersensitive Reaktion kann nur an Pflanzen bzw. pflanzlichen Gewebekulturen mit Zellverbänden untersucht werden, da Protoplasten von hypersensitiv reagierenden Pflanzen keine nekrotische Reaktion zeigen. Zellkontakt ist offensichtlich Voraussetzung für die Expression des "NN"-Gens.

Die Isolierung lebensfähiger Protoplasten mit hoher Ausbeute aus dem Ausgangsmaterial ist der erste Schritt zur Erstellung eines Infektionssystems mit Protoplasten.

Bei der Isolierung von Protoplasten aus Tabakblättern bestätigte sich der schon früher auch von anderen Autoren festgestellte Einfluss der Jahreszeit auf den physiologischen Zustand des Ausgangsmaterials und auf die Protoplastenausbeute aus Blättern (Takebe et al., 1968; Watts et al., 1974; Mertes, 1979). Die Ausbeute intakter Protoplasten sank in den Wintermonaten bei Isolierung mit der Zwei-Schritt-Methode um den Faktor 3 - 4,5, bei Isolierung mit der Ein-Schritt-Methode um den Faktor 5 - 10.

Die Ein-Schritt-Methode (Beier u. Bruening, 1975) war hinsichtlich der Protoplastenausbeute und -qualität der

Zwei-Schritt-Methode (Takebe et al., 1968) überlegen. Die Ausbeute intakter Protoplasten betrug in den Sommermonaten $6,3 \cdot 10^6 - 1,2 \cdot 10^7$ intakte Protoplasten/g Gewebe. Sie war ganzjährig um den Faktor 2 - 4 höher, der Anteil defekter Protoplasten ca. 66% niedriger als bei der Zwei-Schritt-Methode. Die Ursache liegt in der geringen mechanischen Beanspruchung des Blattgewebes und der Protoplasten. Voraussetzung für die Anwéndung der Ein-Schritt-Methode war die Entfernung der Epidermis. Durch Abziehen mit einer Pinzette konnte bei dem vorliegenden Pflanzenmaterial die Epidermis nicht ausreichend entfernt werden. Durch Abpinseln der Epidermis mit Korund (Beier u. Bruening, 1975) konnte die Epidermis vollständig und leicht entfernt werden. Probleme durch Korundverunreinigung in den Protoplastenpräparationen traten nicht auf. Die Möglichkeit der Fusion von Protoplasten während der Isolierung nach der Ein-Schritt-Methode wird durch die vorangehende Plasmolyse des Blattgewebes verhindert. Die Plasmolyse ermöglicht zudem einen optimalen Kontakt der Gewebestücke mit dem Enzymgemisch.

Die Regenerationsfähigkeit der Tabakprotoplasten wurde anhand von Kallusbildung auf Nähragar mit 0,5 M Mannit nachgewiesen. Die Verwendung von Filterpapierscheibchen (Partanen, 1981) verhinderte das Absinken von Protoplasten in tiefere Agarschichten wodurch die Regenerationsfähigkeit der Protoplasten beeinträchtigt wird. Mit dieser Methode wurde in jedem Ansatz zur Protoplastenregeneration Kallusbildung erzielt und damit bewiesen, dass die isolierten Protoplasten nicht nur lebensfähig, sondern auch regenerationsfähig waren. Das Versorgen des Kallusgewebes mit frischem Nähragar konnte durch Umsetzen der kallustragenden Filterplättchen problemlos und schnell durchgeführt werden. Durch Verwendung von Costar-Gewebekulturplatten können auch kleine Protoplastenvolumina zur Kallusbildung inkubiert werden und die Ausbreitung einer eventuellen Kontamination ist behindert.

Die Isolierung von Protoplasten aus einer Sojazellsuspension (*Glycine max*) nach der Methode von Negrutiu, Beetfink und Jacobs (1975) lieferte unabhängig von der Jahreszeit eine Protoplastenausbeute von $4 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^6$ intakter Protoplasten/ml Zellsuspension. Die Ausbeute liegt 30 - 40% unter der Ausbeute vor 3 Jahren (Mertes, 1979). Eine Ursache hierfür konnte nicht gefunden werden. Es ist nicht bekannt, ob eine kontinuierliche Zellsuspensionskultur im Verlauf mehrjähriger Kultivierung ihre Eigenschaft daraus Protoplasten isolieren zu können, verändert. Der Nachweis der Regenerationsfähigkeit der Sojaprotoplasten anhand von Kallusbildung ist bei Verwendung von Filterscheibchen auf Nähragar mit 0,3 M Mannit möglich (Gras, pers. Mitteilung).

Aus einer Zellsuspension von *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. konnten nach der Methode von Negrutiu, Beetfink und Jacobs (1975) bei Zusatz von 1% KDS $4,7 - 7,2 \cdot 10^5$ intakte Protoplasten/ml Zellsuspension unabhängig von der Jahreszeit isoliert werden. KDS-Zusatz während der Isolierung stabilisiert die Protoplastenmembran. Ohne KDS war die Ausbeute intakter Protoplasten durchschnittlich um 37% schlechter.

Das Verhalten der aus einer Suspensionskultur isolierten Tabakprotoplasten in Agarkultur erfüllte die für eine Infektion notwendige Forderung nach einer Lebensdauer von mehreren Tagen nach der Isolierung. Noch 3 Wochen nach der Isolierung waren 31% der Protoplasten funktionsfähig.

Der Arbeitsaufwand zur Isolierung von Protoplasten aus Zellsuspensionskulturen ist gegenüber der Protoplastenisolierung aus Tabakblättern durch das Wegfallen von Oberflächensterilisation und mechanischer Aufarbeitung der Blätter vermindert. Artefakte durch Kontamination in weiterführenden Versuchen können ausgeschlossen werden, wenn Zellkulturen als keimfreies Ausgangsmaterial zur Protoplastenisolierung verwendet werden.

Protoplasten aus Tabakblättern konnten mit freier Nukleinsäure des Tabakmosaikvirus infiziert werden. Die für eine Infektion notwendige RNS-Konzentration betrug 1 µg/ml.

Die Infektion von Protoplasten mit Nukleinsäure wird durch eine gesteigerte Nukleaseproduktion der Protoplasten erschwert. Pflanzenzellen geben Nukleasen ins Medium ab (Heyn u. Schilperoort, 1973; Lurquin u. Hotta, 1975). In Protoplasten wird die *de novo*-Synthese von Ribonuklease durch das hypertonische Medium stimuliert. Premecz et al. (1977) fand eine Korrelation zwischen der Osmolarität des Mediums und der RNase-Aktivität in Protoplasten.

Die meisten Autoren berichten daher über die Notwendigkeit höherer RNS-Konzentration (10 - 100 µg/ml) bei der Erstellung eines Infektionssystems aus Protoplasten und viraler Nukleinsäure (für TMV-RNS: Sarkar et al., 1974; Dawson et al., 1978; Motoyoshi u. Oshima, 1979). In dieser Arbeit betrug die maximale TMV-Ausbeute 38 h p.i. nach RNS-Infektion im Vergleich mit früheren Ergebnissen bei TMV-Infektion von Tabakprotoplasten 32% (Mertes u. Sander, 1981). Die Effizienz der TMV-RNS-Infektionsversuche, d.h. der Anteil an infizierten Protoplasten, betrug maximal 36%. Bei Infektionsversuchen mit TMV-Viruspartikeln lag die Effizienz über 90% (Mertes u. Sander, 1981). Die Ursache sowohl für den geringeren Infektionserfolg bei RNS-Infektion wie auch für die teilweise hohen RNS-Quantitäten in anderen Infektionssystemen liegt sicher in der Sensitivität der viralen RNS gegen Ribonukleasen.

Das Bestreben bei der Infektion von Protoplasten mit Nukleinsäure ist daher, den Gehalt oder die Aktivität der im Infektionssystem enthaltenen Nukleasen herabzusetzen. In dieser Arbeit wurden hierzu verschiedene Methoden verglichen.

Nach Sarkar et al. (1974) ist die RNase-Aktivität bei alkalischem pH (pH 9,0) und hoher Salzkonzentration nahezu vollständig gehemmt. Er infizierte Protoplasten aus Tabakblättern mit 4 - 40 µg RNS/ml. In dieser Arbeit konnte mit derselben Infektionsmethode keine erfolgreiche Infektion durchgeführt werden. Auch Dawson et al. (1978) und Okuno u. Furusawa (1978) konnten mit dieser Methode keine Protoplasten mit RNS infizieren. Möglicherweise werden die Protoplasten durch die hohe Salzkonzentration geschädigt, denn bei Verwendung von Mannit- statt Salzplasmolytikum konnten in dieser Arbeit Protoplasten mit allerdings geringem Infektionserfolg bei pH 9,0 mit TMV-RNS infiziert werden.

Takebe (Suzuki u. Takebe, 1976) verwendete für die Infektion von Tabakblattprotoplasten mit fd-DNS $ZnSO_4$. Zinksalze hemmen die Aktivität pflanzlicher Nukleasen (Frisch-Niggemeyer u. Reddi, 1957). Okuno und Furusawa (1978) infizierten Gersteprotoplasten mit 1 µg/ml Bromemosaikvirus-RNS bei 0°C (reduzierte Enzymaktivität) und mit Zusatz von 1 mM $CaCl_2$, welches die RNS durch Konfigurationsänderungen gegen RNasen schützen und die Protoplastenmembran stabilisieren soll. Mit beiden Infektionsmethoden konnten in dieser Arbeit Tabakprotoplasten mit 1 µg/ml TMV-RNS infiziert werden. Die TMV-Ausbeute konnte jedoch bei der letztgenannten Methode sogar um den Faktor 4 - 7 gesteigert werden, wenn dem Enzymgemisch zur Protoplastenisolierung 0,1 µg/ml Cycloheximid zugesetzt wurde (Okuno u. Furusawa, 1978). Cycloheximid hemmt die Peptid-Elongation (Mc Keehan u. Hardesty, 1969) an den cytoplasmatischen Ribosomen. Die nach 3 Stunden Inkubation in cycloheximidhaltiger Enzymlösung reduzierte Proteinsynthese der Protoplasten vermindert vermutlich den RNase-Gehalt in den Protoplasten und erleichtert so die Infektion mit freier Virus-RNS.

Eine stimulierende Wirkung von Polykationen wie PLO auf die Infektion mit Virus-RNS wird von mehreren Autoren berichtet (Aoki u. Takebe, 1969; Suzuki u. Takebe, 1976; Motoyoshi et al., 1973; Okuno u. Furusawa, 1978). Sarkar (1974) diskutiert die Wirkung des PLO als Schutz vor Nukleasen durch direkte Interaktion zwischen RNS und PLO. Bei Infektion in alkalischem Medium (gehemmte RNase-Aktivität) konnte er keine Infektionssteigerung durch PLO feststellen. Eine durch PLO gesteigerte Pinocytose-aktivität (Takebe, 1975) wird von Okuno und Furusawa (1978) ausgeschlossen, da Pinocytose als energieabhängiger Vorgang bei Infektion bei 0°C gehemmt sein muss und dennoch eine Stimulation durch PLO vorhanden war. Sie diskutieren einen passiven Influx der RNS-Moleküle durch von PLO verursachte Membranläsionen. Nach Suzuki u. Takebe (1978) verhindert die Zugabe von $ZnSO_4$ während der Vorinkubation von Nukleinsäure mit PLO die infektionsfördernde Wirkung des PLO. Möglicherweise wird die von Sarkar diskutierte Anlagerung von PLO an die RNS durch Anwesenheit von Zinkionen gestört. Die Ergebnisse dieser beiden Autoren lassen vermuten, dass der Schutz der RNS vor Nukleasen die wesentliche Wirkung des PLO darstellt.

Protoplasten aus einer Sojazellsuspension konnten in dieser Arbeit nicht mit TMV-RNS infiziert werden. In früheren Experimenten wurden Infektionserfolge mit TMV-Partikeln in der gleichen Grössenordnung wie bei Protoplasten aus Tabakblättern erzielt (Mertes u. Sander, 1981). Möglicherweise ist in Suspensionskulturzellen und in daraus isolierten Protoplasten die Nukleaseproduktion aufgrund der unnatürlichen Kultivierung in Flüssigkultur erhöht. Suzuki u. Takebe (1978) schreiben, dass Protoplasten aus Blattgewebe für die Infektion mit DNS besser geeignet sind als Protoplasten aus Suspensionskulturzellen und dass heterologe DNS in Suspensionskultur-Protoplasten wesentlich stärker abgebaut wird als in Protoplasten aus Blättern. Dies spricht für eine unterschiedliche

Nukleaseaktivität in den beiden Protoplastentypen.

Die unterschiedliche Beleuchtung von Tabak- und Sojaprotoplasten während der Inkubation zur Virussynthese (Tabakprotoplasten bei 1000 Lux Dauerlicht, Sojaprotoplasten im Dunkeln) ist keine mögliche Ursache für den fehlenden Infektionserfolg bei Sojaprotoplasten, da die Virusreplikation in Protoplasten auch im Dunkeln abläuft (u.a. Zaitlin, 1974). Für die Sojaprotoplasten wurden die Kulturbedingungen der Sojazellkultur übernommen, da deren Zellen an Dunkelheit adaptiert sind und bei Beleuchtung nicht mehr kultiviert werden können. Nach Infektion mit Viruspartikeln war die Virusreplikation in bei Dunkelheit inkubierten Sojaprotoplasten bereits nachgewiesen worden (Mertes u. Sander, 1981).

Auch bei der Infektion der Protoplasten mit fd-Phagen wurde eine unterschiedlich starke Inaktivierung des Phagen in Protoplasten aus Blättern und Protoplasten aus einer Zellsuspension (*Glycine max*) festgestellt. Bis 48 h p.i. konnten im Sediment der Tabakblatt-Protoplasten noch 20% der Infektiosität der 0 h-Probe nachgewiesen werden. Bei mit fd-Phagen infizierten Suspensionskultur-Protoplasten waren schon 21 h - 38 h p.i. keine infektiösen Phagenpartikeln mehr nachzuweisen. In beiden Infektionssystemen wurde keine Zunahme infektiöser Phagenpartikeln, die auf eine Vermehrung des Phagen hätte schliessen lassen, beobachtet. Mielicke (1975) hatte über eine Infektion von Tabakblatt-Protoplasten mit fd-Phagen (max. Vermehrungsfaktor = 10) berichtet. Vermutlich war dieser Infektionserfolg ein Artefakt, zum einen verursacht durch Adsorption des Phagen an defekte Protoplasten, zum anderen durch unterschiedliche Probennahme in 0 h-Wert (Kontrolle) und den zu einem späteren Zeitpunkt nach der Infektion genommenen Proben.

Da sowohl bei der Infektion mit TMV-RNS als auch bei der Infektion mit fd-Phagen im Infektionssystem mit Zellkultur-Protoplasten das infektiöse Agens eher abgebaut wurde als im Infektionssystem mit Tabakblatt-Protoplasten, wurden Versuche zur Infektion mit fd-DNS nur mit aus Tabakblättern isolierten Protoplasten durchgeführt.

Sander (1964 u. 1967) konnte in mit fd-DNS beimpften Tabakpflanzen infektiöse Phagenpartikeln nachweisen. Die Ausbeute war in Relation zur eingesetzten DNS-Menge sehr klein. Sander diskutiert, dass zumindest die Synthese von Phagenhüllprotein in den Zellen der Tabakblätter möglich ist. In dieser Arbeit konnten in Tabakprotoplasten nach Infektionen mit fd-DNS keine infektiösen Phagenpartikeln nachgewiesen werden. Nach der Infektion konnte fd-DNS nur in der Protoplastenmembran, nicht im Zellinneren autoradiographisch nachgewiesen werden.

Nach den Ergebnissen von Premecz et al. (1977), wonach die RNase-Aktivität in Protoplasten aufgrund von osmotischem Stress erhöht ist, kann angenommen werden, dass auch die DNase-Aktivität in Protoplasten höher als in den Ausgangspflanzen ist. Die notwendige hohe Sensitivität des Testsystems für fd-DNS ist dann bei Verwendung von Protoplasten nicht mehr gewährleistet. Zahlreiche andere Autoren berichten über Infektionsversuche mit Protoplasten und heterologer Nukleinsäure aus Phagen und Bakterien (Suzuki u. Takebe, 1976 u. 1978; Kool u. Pelcher, 1978; Heyn u. Schilperoort, 1973; Hughes et al., 1977). Alle Experimente zeigen, dass die heterologe DNS in den Protoplasten abgebaut wird. Hingegen wird bei Matthiola-Keimlingen die Bindung von T_4-Phagen-DNS an pflanzliche DNS beschrieben (Gradmann-Rebel u. Hemleben, 1976). Offensichtlich widersteht in diesem natürlichen System die Phagen-DNS teilweise den Nukleaseaktivitäten.

Pflanzliche Zellkulturen sind ein sensibel reagierendes System und erfordern die genaueste Einhaltung der Kulturbedingungen über einen langen Zeitraum, verbunden mit der Gefahr von Kontamination oder technischem Versagen. Möglicherweise können genetische Veränderungen und Selektion eine Zellinie im Laufe der Jahre verändern. Es wäre daher wünschenswert, eine pflanzliche Zellinie durch Einfrieren und anschliessende Rekultivierung erhalten zu können.

Die Rekultivierung eingefrorener Zellen einer Zellinie von *Glycine max* konnte in dieser Arbeit nicht erreicht werden. Da die Ergebnisse eine Schädigung der Sojazellen durch die Kälteschutzmittel ausschliessen, waren die Prozesse des Einfrierend bzw. Auftauens der Zellen die kritischen Faktoren. Nach Withers (Review, 1980) ist das Einfrieren von Pflanzenzellen vor allem durch die osmotische Labilität der Zellen erschwert. Ungleichmässige Eisbildung innerhalb der Kompartimente der Pflanzenzelle oder zwischen Pflanzenzelle und Umgebung führt zu einem die Zelle dauerhaft schädigenden osmotischen Ungleichgewicht. Da sich verschiedene Zellinien, auch derselben Varietät in Zellgrösse, Zellaggregation, Wassergehalt und Vakuolisierung unterscheiden, muss für jede Zellinie eine geeignete Einfriermethode neu erstellt werden.

Nach Withers ist programmiertes Einfrieren die Grundvoraussetzung für das Einfrieren pflanzlicher Zellen. Das unkontrollierte Einfrieren in einer Styropor-Box im Tiefkühlschrank, wie es mit tierischen Zellen erfolgreich durchgeführt wird (u.a. Dietzgen, 1981), ist für das Einfrieren pflanzlicher Zellen ungeeignet. Withers empfiehlt, beim programmierten Einfrieren die Temperatur nach Absenkung um 1°C/min bei -30°C vorübergehend anzuhalten, da bei dieser Temperatur den Zellen

das Wasser durch extrazelluläres Gefrieren entzogen wird.

Als besonders geeignete Kälteschutzmittel nennt Withers DMSO, Glycerin, Zucker und Aminosäuren, insbesondere Prolin sowie stabilisierende Zusätze wie Pepton und Poly-vinylpyrrolidon. Die Kälteschutzmittel müssen vor dem Einfrieren wenigstens über eine Stunde hinweg zugegeben werden, damit eine genügende Aufnahme durch die Zellen gewährleistet ist. Die Zellen müssen währenddessen auf Eis gehalten werden, um eine mögliche toxische Wirkung der Kälteschutzmittel zu verhindern.

Nach Withers ist das Einfrieren pflanzlicher Zellkulturen noch nicht in einem Stadium routinemässiger Methoden. Als besonders geeignete Zellsysteme werden *Daucus carota* und *Zea mays* genannt.

Für die Anwendung eines Screening-Systems für antiviral wirkende Substanzen, sollte ein möglichst sensitives System kontinuierlich zur Verfügung stehen. Tabakpflanzen stellen ohne Zweifel ein sensitives System dar, gut infizierbar mit TMV-Virus, TMV-RNS und sogar fd-DNS. Jedoch erfordert die Anzucht von Tabakpflanzen einen grossen Aufwand an Gewächshäusern und Arbeit. Zudem schwankt die Sensitivität der Pflanzen, wie bereits diskutiert, sehr stark, nahezu bis zu Unempfindlichkeit gegen Virusinfektionen. Ein möglichst kontinuierlich zur Verfügung stehendes *in vitro*-Infektionssystem ist daher Voraussetzung für Screening-Versuche.

In dieser Arbeit erwiesen sich Tabakprotoplasten aus Blattmaterial als sensitivstes *in vitro*-Infektionssystem, da sie nicht nur mit TMV (Mertes u. Sander, 1981) sondern auch mit niedrigen Quantitäten TMV-RNS infiziert werden konnten. Die Wirksamkeit antiviral wirkender Substanzen wurde an Tabakblattprotoplasten bereits erprobt und nach-

gewiesen (Huber, pers. Mitteilung). Jedoch ist auch dieses System nach wie vor abhängig von der Anzucht von Ausgangspflanzen für die Protoplasten.

Bei Verwendung von Zellsuspensionskulturen bzw. daraus isolierten Protoplasten als Screening-System wird auch das Ausgangsmaterial für die Infektionsversuche *in vitro* angezogen. Damit ist die wichtige Voraussetzung nach von Jahreszeit und klimatischen Schwankungen unabhängigen Experimenten erfüllt. Da Protoplasten aus einer Zellsuspensionskultur in dieser Arbeit jedoch nicht mit Virusnukleinsäure infiziert werden konnten, muss eine eingeschränkte Sensitivität von *in vitro*-Zellen gegenüber Virus-RNS diskutiert werden. Da aber Protoplasten aus einer Sojazellsuspension mit gleichem Infektionserfolg wie Protoplasten aus Tabakblättern bereits mit TMV-Partikeln infiziert werden konnten (Mertes u. Sander, 1981) und Infektionen bei Screening-Versuchen im allg. mit Viruspartikeln durchgeführt werden, sind auch Protoplasten aus *in vitro*-Kulturen für Testreihen mit antiviralen Substanzen geeignet.

Soll eine grössere Anzahl Substanzen auf ihre antivirale Wirkung getestet werden, stellt die ständig notwendige Isolierung von Protoplasten, auch aus Zellsuspensionen, einen beträchtlichen Arbeitsaufwand dar. Werden hingegen die ganzen Zellen der Kultur infiziert, ist der Arbeitsaufwand, sowohl hinsichtlich der Anzucht des Ausgangsmaterials, als auch hinsichtlich der Infektionsversuche auf ein Minimum reduziert. Tabakzellen in Suspensionskultur, welche in dieser Arbeit mit TMV infiziert werden konnten, stellen daher ein für Screening-Verfahren von antiviral wirkenden Substanzen geeignetes, einfaches Infektionssystem dar. Da aus den Zellen der Kultur Protoplasten isoliert werden können, sind Infektionsversuche auf Einzelzellniveau bei Bedarf möglich.

V. Zusammenfassung

Aus Blättern von *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. wurden Protoplasten isoliert und zu Kallusgewebe regeneriert, aus dem eine kontinuierliche Tabakzellsuspensionskultur erstellt werden konnte. Nach Untersuchung der Wuchsstoffbedürfnisse der Kultur wurde eine schnell wachsende Zellinie aus vorwiegend sphärischen Zellen und Zellaggregaten selektioniert, die alle 4 - 5 Tage ca. 1:10 mit frischem Medium verdünnt wurde.

Tabakzellen in Suspensionskultur konnten mit Tabakmosaikvirus infiziert werden. Die Virusvermehrung verlief in zwei Zyklen und erhöhte sich im zweiten Zyklus nach 3 Tagen Kulturdauer um den Faktor 28. Die Infektion einer Zellsuspensionskultur unter Verwendung eines Vortex-Gerätes erfordert ein Minimum an Arbeitsaufwand und ist daher für Screeningverfahren antiviraler Substanzen geeignet.

Aus Tabakzellen in Suspensionskultur konnten Protoplasten isoliert werden. Die Ausbeute betrug unabhängig von der Jahreszeit 4,7 - 7,2 · 10^5 Protoplasten/ml Zellsuspension.

Tabakprotoplasten aus Blattgewebe konnten mit Tabakmosaikvirus-RNS infiziert werden. Bei Verwendung von 0,1 µg/ml Cycloheximid während der Protoplastenisolierung und 1 µg/ml PLO sowie 1 mM $CaCl_2$ während der Infektion betrug der Anteil infizierter Protoplasten bis zu 36%.

Protoplasten aus einer Zellsuspensionskultur (*Glycine max*), die bereits früher mit Tabakmosaikvirus infiziert werden konnten, konnten mit Tabakmosaikvirus-RNS nicht infiziert werden.

Sowohl Protoplasten aus Tabakblättern als auch Protoplasten aus einer Zellsuspensionskultur konnten nicht mit fd-Phagen oder fd-Phagen-DNS infiziert werden. Es konnte keine Neubildung infektiöser Phagenpartikeln oder Bildung von Phagenprotein nachgewiesen werden. In Tabakprotoplasten konnte fd-DNS nur an der Zellmembran, nicht im Zellinneren durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

Aus einer Zellsuspension (*Glycine max*) konnten nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff keine lebenden Zellen rekultiviert werden.

VI. Literaturverzeichnis

Adam, G. (1976): Untersuchung verschiedener Stämme des Pea Enation Mosaik Virus im Hinblick auf ihre Übertragbarkeit durch den Blattlausvektor Acyrthosiphon pisum (Harr.). Dissertation, Institut für Biologie II, Universität Tübingen.

Aoki, S., Takebe, I. (1969): Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid. Virology 39: 439-448.

Beachy, R.N., Murakishi, H.H. (1973): Effects of cycloheximide on tobacco mosaic virus synthesis in callus from hypersensitive tobacco. Virology 55: 320-328.

Beier, H., Bruening, G. (1975): The use of an abrasive in the isolation of cowpea leaf protoplasts which support the multiplication of cowpea mosaic virus. Virology 64: 272-276.

Burgess, J., Motoyoshi, F., Fleming, E.N. (1973): The mechanism of infection of plant protoplasts by viruses. Planta 112: 323-332.

Carlson, P.S. (1973): The use of protoplasts for genetic research. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 70: 598-602.

Dawson, J.R.O., Dickerson, P.E., King, J.M., Sakai, F., Trim, A.R.H., Watts, J.W. (1978): Improved methods for infection of plant protoplasts with viral ribonucleic acid. Z. Naturforsch. (C) 33: 548-551.

Dietzgen, R. (1981): Herstellung von Pflanzenvirus-Antikörper sekretierenden Hybridzellkulturen. Dipl.-Arb., Institut für Biologie II, Universität Tübingen.

Documenta Geigy (1968): Wissenschaftliche Tabellen, 7. Aufl., J.R. Geigy S.A., Basel

Frisch-Niggemeyer, W. Reddi, K.K. (1957): Studies on ribonuclease in tobacco leaves. I. Purification and properties. Biochim. Biophys. Acta 26: 40-46.

Gamborg, O., Miller, R., Ojima, K. (1968): Nutrient Requirements of Suspensioncultures of Soybean Root Cells. Exp. Cell. Res. 50: 151-158.

Gierer, A., Schramm, G. (1956): Invectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. Nature 177: 702-703.

Gradmann-Rebel, W., Hemleben, V. (1976): Incorporation of T_4-Phage DNS into a specific DNS fraction from higher plant Matthiola incana. Z. Naturforschg. 31: 558-564.

Hemleben, V., Ermisch, N., Kimmich, D., Leber, B., Peter, G. (1975): Studies on the fate of homologous DNA applied to seedlings of Matthiola incana. Eur. J. Bioch. 56: 403-411.

Heyn, R.F., Schilperoort, P.A. (1973): The use of protoplasts to follow the fate of Acrobacterium tumef. DNA on incubation with tobacco cells. Coll. int. C.N.R.S., No. 212: 385-395.

Hoffmann-Berling, H., Marvin, D., Dürwald, H. (1963): Ein fädiger DNS-Phage (fd) und ein sphärischer RNS-Phage (fr), wirtsspezifisch für männliche Stämme von E. coli. Z. für Naturforschung 18: 876-883.

Hughes, B.G., White, F.G., Smith, M.A. (1977): Fate of bacterial plasmid DNS during uptake by barley protoplasts. FEBS Letters. 79: 80-84.

Jarvis, N.P., Murakishi, H.H. (1980): Infection of protoplasts from soybean cell culture with southern bean mosaic and cowpea mosaic viruses. J. Gen. Virol. 48: 365-376.

Knippers, R., Hoffmann-Berling, H. (1966): A coat protein from bacteriophage fd. J. mol. Biol. 21, 281-292.

Kool, A.J., Pelcher, L.E. (1978): Conditions that affect binding of DNA by cultured plant cells and protoplasts: an autoradiographic analysis. Protoplasma 97: 71-84.

Lurquin, P.F., Hotta, Y. (1975). Reutilization of bacterial DNA by Arabidopsis thaliana cells in tissue cultures. Pl. Sc. Letters 5: 103-112.

Mc Keehan, W., Hardesty, B. (1969): The mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in rabbit reticulocytes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 36: 625-630.

Mertes, G. (1979): Vergleich der Infizierbarkeit mit Tabakmosaikvirus von Protoplasten aus Sojabohnen-Zellen in Suspensionskultur und von Protoplasten aus Tabakblättern. Dipl.-Arb., Institut für Biologie II, Universität Tübingen.

Mertes, G., Sander, E. (1981): Virus infection of protoplasts from a plant cell suspension culture as possible screening system for antiviral substances. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent., 46/3: 1019-1029.

Mielcke, G. (1975): Infektion von Protoplasten aus Nicotiana tabacum mit dem Bakteriophagen fd., Dipl.-Arb., Institut für Biologie II, Universität Tübingen.

Motoyoshi, F., Oshima, N. (1968): Multiplication of tobacco mosaic virus in suspension culture of tobacco cells. Jpn. J. Microbiol. 12: 317-320.

Motoyoshi, F., Oshima, N. (1979): Standardization in inoculation procedure and effect of a resistance gene on infection of tomato protoplasts with tobacco mosaic virus RNA. J. Gen. Virol. 44: 801-806.

Motoyoshi, F., Bancroft, J.B., Watts, J.W., Burgess, J. (1973): The infection of tobacco protoplasts with cowpea chlorotic mottle virus and its RNA. J. Gen. Virol. 20: 177-193.

Nagata, T., Takebe, J. (1971): Plating of isolated mesophyll protoplasts on agar medium. Planta 99: 12.

Negrutiu, J., Beetfink, F., Jacobs, M. (1975): Arabidopsis thaliana as a modell system in somatic ell genetics. Plant Sc. Letters 5: 293-304.

Murakishi, H.H., Hartmann, J.X., Beachy, R.N., Pelcher, L.E. (1971): Growth curve and yield of TMV in tobacco callus cells. Virology 43: 62-72.

Okuno, T. Furusawa, I. (1978c): Factors influencing the infection of barley mesophyll protoplasts with brome mosaic virus RNA. J.Gen. Virol. 41: 63-75.

Otsuki, Y., Takebe, I. (1969): Fluorescent antibody staining of tobacco mosaic virus antigen in tobacco mesophyll protoplasts. Virology 38: 497-499.

Opatrny, Z., Opatrna, J. (1976): The specifity of the effect of 2,4-D and NAA on the growth, micromorphology and occurence of starch in longtern Nicotiana tabacum L. cell strains. Biol. Plant. 18, 359-365.

Partanen, C.R. (1981): Filter paper as a support and carrier for plant protoplast cultures. In Vitro 17: 77-80.

Premecz, G., Olah, T., Gulyaš, A., Nytrai, A., Palfi, G., Parkas, G.L. (1977): Is the increase in ribonuclease level in isolated tobacco protoplasts due to osmotic shock? Pl. Sc. Letters 9: 195-200.

Sander, E. (1964): Evidence of the synthesis of a DNA phage in leaves of tobacco plants. Virology 24: 545-550.

Sander, E. (1967): Alteration of fd-phage in tobacco leaves. Virology 33: 121-130.

Sarkar, S. Upadhya, M.D., Melchers, G. (1974): A highly efficient method of inoculation of tobacco mesophyll protoplasts with ribonucleic acid of tobacco mosaic virus. MGG 135: 1-9.

Schwarz, H., Thilo, L. (1983): Plasma membrane glyco-konjugates internalized and recycled during fluid phase pinocytosis enter the Golgi complex. Zur Veröffentlichung angenommen von Eur. J. Cell. Biol.

Suzuki, M., Takebe, J. (1976): Uptake of single-stranded bacteriophage DNA by isolated tobacco protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 78: 421-433.

Suzuki, M., Takebe, J. (1978): Uptake of double-stranded bacteriophage DNA by isolated tobacco leaf protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 89: 297-311.

Takebe, I. (1975b): The use of protoplasts in plant virology. Annu. Rev. Phytopathol. 13: 105-125.

Takebe; I., Otsuki, Y. (1969): Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 64: 843-848.

Takebe, I., Otsuki, Y., Aoki, S. (1968): Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant Cell Physiol. 9: 115-124.

Takebe, I., Otsuki, Y. (1973): Fine structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Planta 113: 21-27.

Taylor, A.R.D., Hall, J.L. (1978): Fine structure and cytochemical properties of tobacco leaf protoplasts and comparison with the source tissue. Protoplasma 96: 113-126.

Uchimiya, H., Murashige, T. (1974): Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. Plant. Physiol. 54: 936-944.

Watts, J.W., Motoyoshi, F., King, J. (1974): Problems associated with the production of stable protoplasts of cells of tobacco mesophyll. Ann. Bot (Lond) 38: 667-671.

Wilson, H.M:, Street, H.E. (1975): The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension cultures of Hevea brasiliensis. Ann. Botan. 39: 671-682.

Withers, L.A. (1980): Low temperature storage of plant tissue cultures. Adv. in Bioch. Engineering 18: 101-149.

Wu, F.S., Murakishi, H.H. (1978): Infection and synthesis rate of southern bean mosaic virus in soybean callus cells under selected cultural conditions. Phytopathology 68: 1389.

Wu, F.S., Murakishi, H.H. (1979): Synthesis of virus and virus-induced RNA in southern bean mosaic virus-infected soybean cell cultures. J. Gen. Virol. 45: 149-160.

Zaitlin, M., Beachy, R.N. (1974): The use of protoplasts and separated cells in plant virus research. Adv. Virus Res. 19: 1-35.

L E B E N S L A U F

Am 30.08.1953 wurde ich in Stuttgart als Tochter von Diplom-Volkswirt Dr. Werner Mertes und seiner Frau Hedwig, geb. Heim, geboren.

Von 1961-1973 besuchte ich in Stuttgart die Grundschule und das Ev. Heidehofgymnasium für Mädchen, an dem ich 1973 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1973/74 begann ich an der Universität Tübingen das Studium der Fächer Mikrobiologie, Pflanzenphysiologie, Genetik und Biochemie. Das Biologie-Diplom erhielt ich am 08.11.1979 von der Fakultät für Biologie zuerkannt.

Im Februar 1980 begann ich unter Anleitung von Frau Prof. Dr. E. Sander am Institut für Biologie II der Universität Tübingen mit der Durchführung dieser Dissertation, die im November 1982 abgeschlossen wurde. Ab 01.09.1980 war ich am Lehrstuhl für Genetik sowie am Lehrstuhl für Mikrobiologie I als wissenschaftliche Hilfskraft tätig.

Meine akademischen Lehrer waren:

Bentrup	Lorenz
Braun	Sander
Frank	Schwemmle
Guglielmi	Seyffert
Hemleben	Zähner
Löffler	